



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**Inmovilización de un cultivo mixto asociado al grano de  
café para la degradación de hidrocarburos en ambientes  
acuáticos**

Tesis que presenta

**Sonia Miriam Acosta Rubí**

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Director de la Tesis: **Dra. Refugio Rodríguez Vázquez**

**Ciudad de México**

**FEBRERO, 2017**

# Agradecimientos y Dedicatoria

---

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada No. 233454.

Agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de este periodo de tiempo, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad.

Agradezco a mi madra, Elizabeth Rubí Guzmán, por apoyarme en todo momento, por los valores que me inculcó y por creer en mí.

Agradezco el apoyo y dedicación a cada uno de los integrantes de mi comité tutorial, por sus valiosos consejos y recomendaciones, porque con su experiencia y aportes enriquecieron este trabajo.

Agradezco a mi esposo Gerardo Guadarrama del Valle por su apoyo incondicional durante mi estadía en el doctorado.

Agradezco a mis compañeras de laboratorio Denisse, Diana, Flor, Bertha y Marissa, por haber compartido conmigo sus conocimientos, su tiempo y sobre todo su amistad.

Agradezco a Atenea Villegas Vargas, auxiliar de investigación y a la estudiante de doctorado de química, Carolina Sánchez López, por sus valiosos consejos y apoyo con respecto al HPLC.

# TABLA DE CONTENIDO

---

Agradecimientos y dedicatoria .....	I
Índice de tablas.....	V
Índice de gráficos.....	VI
Índice de figuras .....	VIII
Índice de ecuaciones.....	IX
Resumen.....	X
Abstract .....	XII
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>4</b>
2.1 HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO .....	4
2.1.1 Hidrocarburos poliaromáticos .....	6
2.2 CONTAMINACIÓN POR HIDROCARBUROS .....	8
2.3 BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS .....	11
2.3.1 Metabolismo de degradación .....	12
2.3.2 Factores que limitan la degradación de hidrocarburos en ambientes acuáticos.....	15
2.4 BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS CONTAMINADAS CON HIDROCARBUROS .....	17
2.4.1 Bioestimulación.....	17
2.4.2 Bioaugmentación.....	17
2.5 MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE HIDROCARBUROS.....	19
2.6 IMPORTANCIA DEL GRANO DE CAFÉ EN LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS .....	23
2.6.1 Microorganismos asociados al grano de café.....	24
2.6.2 Características físico-químicas del grano de café.....	25
2.7 INMOVILIZACIÓN .....	29
2.7.1 Métodos de inmovilización .....	30
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>34</b>
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>35</b>
4.1 GENERAL .....	35
4.2 ESPECÍFICAS .....	35
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>36</b>
5.1 GENERAL .....	36
5.2 ESPECÍFICOS .....	36
<b>6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>37</b>
Primera etapa: Identificación taxonómica.....	37
Segunda etapa: Principales factores que favorecen la degradación de hidrocarburos .....	37
Tercera etapa: Desarrollo del sistema de inmovilización.....	38
Cuarta etapa: Experimentos de degradación de fenantreno.....	38
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>

7.1 MEDIOS DE CULTIVO .....	39
7.1.1 Medio de cultivo empleado en el enriquecimiento secuencial.....	39
7.1.2 Medio de cultivo con balance C:N.....	40
7.1.3 Rosa de bengala (RB).....	41
7.1.4 Verde de malaquita (VM).....	42
7.1.5 Levadura-Malta-Sacarosa (LMS) .....	43
7.1.6 Agar para cuenta en placa (PCA).....	43
7.1.7 Agar nutritivo (AN).....	44
7.1.8 Medio Wunder .....	44
7.1.9 Bushnell-Haas (BH) .....	44
7.2 MÉTODOS ANALÍTICOS .....	45
7.2.1 Cálculo de la capacidad de retención de agua del grano de café .....	45
7.2.2 Monitoreo de la actividad microbiana para la producción del inóculo.....	45
7.2.3 Determinación de cenizas .....	46
7.2.4 Cuantificación de la actividad del agua .....	46
7.2.5 Diseño de experimentos Plackett-Burman.....	46
7.2.6 Cuantificación de azúcares totales con reactivo de antrona .....	47
7.2.7 Determinación de amonio por el método de azul de indofenol .....	48
7.2.8 Determinación de nitrato por el método de sulfato de brucina.....	48
7.2.9 Determinación de fósforo reactivo por el método del ácido ascórbico .....	48
7.2.10 Cuantificación de fenantreno.....	48
7.2.11 Fijación de las fibras de lufa para su observación por microscopía electrónica de barrido .....	49
7.2.12 Espectroscopía en el infrarrojo cercano de la fibra de lufa .....	49
7.2.13 Cuantificación de proteína total extracelular .....	49
7.2.14 Glucosa oxidasa (GO).....	50
7.2.15 Galactosa oxidasa (GAO) .....	51
7.3 TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS .....	52
7.3.1 Enriquecimiento secuencial.....	52
7.3.2 Identificación de género y posible especie de los hongos filamentosos .....	54
7.3.3 Condiciones de cultivo para las pruebas de actividad enzimática .....	55
7.3.4 Crecimiento en placa en medio sólido Bushnell-Hass .....	55
7.3.5 Cinéticas de crecimiento de cultivos axénicos y co-cultivos en cultivo líquido con hidrocarburos como única fuente de carbono .....	55
7.3.6 Cinéticas de degradación de fenantreno en cultivo líquido con células libres .....	56
7.3.7 Proceso de inmovilización en fibras de <i>Luffa cylindrica</i> .....	57
7.3.8 Cinéticas de degradación de fenantreno en cultivo líquido con células inmovilizadas en fibras de lufa.....	57
7.3.9 Tolerancia a la salinidad de los microorganismos asociados al grano verde de café .....	58
7.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	58
<b>8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>59</b>
8.1 PRIMERA ETAPA: IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA .....	59
8.1.1 Cuenta microbiana.....	59
8.2 SEGUNDA ETAPA: PRINCIPALES FACTORES QUE FAVORECEN LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS.....	68
8.2.1 Producción del inóculo del grano verde de café .....	68
8.2.2 Pruebas de recuperación de fenantreno .....	75

8.2.3 Pruebas de actividad enzimática .....	77
8.2.4 Diseño de experimentos Plackett-Burman para determinar los principales factores químicos que favorecen la degradación de fenantreno en agua destilada .....	79
8.2.5 Experimento para evaluar la degradación de fenantreno en cultivos en suspensión con grano verde de café.....	82
8.2.6 Dosis-Respuesta .....	84
8.2.7 Crecimiento en placa en medio de cultivo Bushnell-Hass con diesel como fuente de carbono .....	85
8.2.8 Cinéticas de crecimiento en cultivo líquido con hidrocarburos como única fuente de carbono de cultivos axénicos y co-cultivos .....	87
<b>8.3 TERCERA ETAPA: DESARROLLO DEL SISTEMA DE INMOVILIZACIÓN .....</b>	<b>93</b>
8.3.1 Exploración de fibras vegetales con uso potencial como soportes de inmovilización .....	93
8.3.2 Diseño factorial 2 <sup>3</sup> para evaluar la disponibilidad de nutrientes en el sistema de inmovilización en <i>Luffa cylindrica</i> .....	97
8.3.3 Espectroscopía en el Infrarrojo Cercano de la fibra de lufa .....	102
8.3.4 Evaluación de las fibras de <i>Luffa cylindrica</i> como soportes de inmovilización .....	103
8.3.5 Cinéticas de crecimiento de células inmovilizadas en <i>Luffa cylindrica</i> .....	106
<b>8.4 CUARTA ETAPA: ENSAYOS DE DEGRADACIÓN DE FENANTRENO (50 MG/L) .....</b>	<b>108</b>
8.4.1 Experimentos de degradación de fenantreno con células libres e inmovilizadas en <i>Luffa cylindrica</i> 1 sin fuente primaria de carbono con un periodo de incubación de seis días.....	108
8.4.2 Efecto del tiempo de incubación en la degradación de fenantreno en ausencia de fuente de carbono.....	110
8.4.3 Efecto de la adición de glucosa como fuente primaria de carbono en la degradación de fenantreno .....	114
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>123</b>
9.1 PRIMERA ETAPA .....	123
9.2 SEGUNDA ETAPA .....	123
9.3 TERCERA ETAPA .....	124
9.4 CUARTA ETAPA .....	124
9.5 CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS .....	125
<b>10. REFERENCIAS .....</b>	<b>126</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>145</b>
ANEXO A: ANÁLISIS DE VARIANZA Y DE REGRESIÓN DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS PLACKETT-BURMAN .....	145
ANEXO B: CARTA DE ACEPTACIÓN DEL ARTÍCULO POR JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND HEALTH, PART A. ....	146

# Índice de Tablas

---

Tabla 1. Propiedades físico-químicas del fenantreno. ....	7
Tabla 2. Características de algunos de los derrames de petróleo de las últimas 50 décadas. ....	10
Tabla 3. Principales géneros de bacterias y hongos degradadores de hidrocarburos. ....	20
Tabla 4. Principales géneros de microorganismos degradadores de hidrocarburos poliaromáticos (HPAs). ..	22
Tabla 5. Composición química porcentual en base seca del grano de café verde y tostado de las especies <i>Coffea arabica</i> y <i>Coffea canephora</i> . ....	25
Tabla 6. Composición porcentual de carbohidratos en base seca del grano verde de café de las especies <i>Coffea arabica</i> y <i>Coffea canephora</i> . ....	26
Tabla 7. Principales ácidos grasos presentes en el grano verde de café, expresado como porcentaje total de lípidos. ....	27
Tabla 8. Composición mineral en base seca del grano verde de café de <i>Coffea arabica</i> . ....	28
Tabla 9. Matriz del diseño Plackett-Burman con los valores codificados de las variables. ....	47
Tabla 10. Características del grano de café según tamaño de partícula. ....	69
Tabla 11. Actividad del agua ( $a_w$ ) del grano verde de café, según tamaño de partícula (TP). ....	70
Tabla 12. Factores y dominio experimental para la producción del inóculo. ....	71
Tabla 13. Matriz de experimentos del diseño Plackett-Burman con los valores naturales y codificados de las variables y los valores de degradación de fenantreno. ....	80
Tabla 14. Capacidad de las cepas aisladas de crecer en medio sólido con diesel como única fuente de carbono. ....	86
Tabla 15. Tipo y cantidad de fibra vegetal empleada en los tratamientos exploratorios. ....	94
Tabla 16. Factores considerados en el diseño factorial $2^3$ y sus niveles alto y bajo. ....	97
Tabla 17. Matriz de experimentos en orden no estándar del diseño factorial $2^3$ con los valores codificados. ....	97
Tabla 18. Tratamientos para los experimentos de degradación en agua destilada por el co-cultivo <i>Candida orthopsilosis</i> - <i>F. solani</i> , con células libres e inmovilizadas en <i>Luffa cylindrica</i> sin glucosa. ....	108
Tabla 19. Tratamientos para los experimentos de degradación en agua destilada por el co-cultivo <i>Candida orthopsilosis</i> - <i>F. solani</i> , con células libres sin glucosa. ....	110
Tabla 20. Tratamientos para los experimentos de degradación en agua destilada con células libres sin glucosa. ....	112
Tabla 21. Tratamientos para los experimentos de degradación en agua destilada con células libres con glucosa. ....	115
Tabla 22. Tratamientos para los experimentos de degradación en agua destilada con células inmovilizadas con glucosa. ....	118
Tabla 23. Tratamientos para los experimentos de degradación en agua de mar con células libres e inmovilizadas en <i>Luffa cylindrica</i> con glucosa. ....	120

# Índice de Gráficos

---

Gráfico 1. Consumo de petróleo crudo a nivel mundial por día. ....	11
Gráfico 2. Conteo de células viables según tratamiento en diferentes medios de cultivo. ....	60
Gráfico 3. Producción de dióxido de carbono, según contenido de humedad, para inóculos con un nivel bajo de tamaño de partícula (< 0.42 mm). ....	72
Gráfico 4. Producción de dióxido de carbono, según contenido de humedad, para inóculos con un nivel intermedio de tamaño de partícula (0.42 - 0.86 mm). ....	72
Gráfico 5. Producción de dióxido de carbono, según contenido de humedad, para inóculos con nivel alto de tamaño de partícula (0.86 y 2.0 mm). ....	73
Gráfico 6. Efecto de la interacción entre los factores tamaño de partícula (TP) y contenido de humedad (CRA) en la producción de dióxido de carbono a tiempo inicial (10a), 24 h (10b) y 48 h (10c) de incubación. ....	74
Gráfico 7. Porcentaje de recuperación de fenantreno (Phe) en agua destilada. ....	76
Gráfico 8. Porcentaje de recuperación de fenantreno (Phe) en agua de mar. ....	77
Gráfico 9. Concentración de proteínas. 9a. Actividad volumétrica de la enzima glucosa oxidasa (GO). 9b. Contenido de proteína total extracelular. 9c. Actividad específica de la enzima Glucosa oxidasa. ....	78
Gráfico 10. Concentración total de fenantreno (Phe) según tratamiento del diseño Plackett-Burman. ....	81
Gráfico 11. Concentración de Fenantreno (Phe) residual en cultivos en suspensión con grano verde de café en agua destilada (AD) y agua de mar (AM) con 3 días de cultivo. ....	83
Gráfico 12. Concentración de Fenantreno (Phe) residual en cultivos en suspensión con grano verde de café en agua destilada con 8 días de cultivo. ....	85
Gráfico 13. Incremento de biomasa en peso seco a los seis días de cultivo. ....	88
Gráfico 14. Incremento en biomasa de <i>Candida orthopsilosis</i> y consumo de nitrógeno y fósforo en cultivos sumergidos con 50 ppm de fenantreno como fuente de carbono. ....	89
Gráfico 15. Ajuste de los datos de crecimiento de <i>Candida orthopsilosis</i> a la ecuación de Gompertz. Cultivos sumergidos con 50 ppm de fenantreno como fuente de carbono. ....	90
Gráfico 16. Incremento en biomasa de <i>Fusarium solani</i> y consumo de nitrógeno y fósforo en cultivos sumergidos con 50 ppm de fenantreno como fuente de carbono. ....	91
Gráfico 17. Ln de la biomasa generada por <i>Fusarium solani</i> en cultivos sumergidos con 50 ppm de fenantreno como fuente de carbono. ....	91
Gráfico 18. Ajuste de los datos de crecimiento de <i>Fusarium solani</i> a la ecuación de Gompertz. Cultivos sumergidos con 50 ppm de fenantreno como fuente de carbono. ....	92
Gráfico 19. Concentración de nutrientes en el caldo de cultivo a los 4 y 9 días de incubación. ....	99
Gráfico 20. Término más significativo del modelo para la variable dependiente azúcares totales (AT) en el cuarto (20a) y noveno (20b) día de cultivo. ....	100
Gráfico 21. Término más significativo del modelo para la variable dependiente fósforo (P) en el cuarto (21a) y noveno (21b) día de cultivo. ....	101
Gráfico 22. Espectroscopías de la fibra de <i>Luffa cylindrica</i> por Espectrometría Infrarroja con transformada de Fourier. ....	103
Gráfico 23. Incremento en peso seco de las fibras de <i>Luffa cylindrica 1</i> (Lc1) y <i>Luffa cylindrica 2</i> (Lc2) al término del proceso de inmovilización de 3 días en cultivo líquido en agua destilada (AD) y agua de mar (AM). ....	104
Gráfico 24. Incremento en biomasa en peso seco en cultivo líquido con <i>L. cylindrica 1</i> como soporte de inmovilización en agua destilada (24a) y agua de mar (24b). ....	106
Gráfico 25. Curvas de crecimiento en en peso seco, en cultivo líquido con <i>L. cylindrica 1</i> como soporte de inmovilización en agua destilada (DW) y agua de mar (SW). ....	107

Gráfico 26. Fenantreno (Phe) residual en co-cultivos de <i>Candida orthopsilosis</i> y <i>Fusarium solani</i> al finalizar el periodo de incubación de 6 días con células libres (C1, C2 y CC) y con células inmovilizadas (I-C1, I-C2 e I-CC). .....	109
Gráfico 27. Fenantreno (Phe) residual en co-cultivos de <i>Candida orthopsilosis</i> y <i>Fusarium solani</i> al finalizar el periodo de incubación de 9 días con células libres. ....	111
Gráfico 28. Fenantreno (Phe) residual en cultivos axénicos y mixtos al finalizar el periodo de incubación de 15 días con células libres en cultivo líquido sin fuente primaria de carbono en agua destilada. ....	113
Gráfico 29. Fenantreno (Phe) residual en cultivos axénicos y mixtos al finalizar el periodo de incubación de 15 días con células libres en agua destilada con 6 g/L de glucosa como fuente primaria de carbono. ....	117
Gráfico 30. Fenantreno (Phe) residual en cultivos axénicos y mixtos al finalizar el periodo de incubación de 15 días con células inmovilizadas en fibra de <i>Luffa cylindrica</i> Roem en agua destilada con 6 g/L de glucosa como fuente primaria de carbono. ....	119
Gráfico 31. Fenantreno (Phe) residual en cultivos axénicos y mixtos al finalizar el periodo de incubación de 15 días con células libres e inmovilizadas en fibra de <i>Luffa cylindrica</i> en agua de mar con 6 g/L de glucosa como fuente primaria de carbono. ....	121



# Índice de Figuras

---

Figura 1. Tipos de compuestos orgánicos presentes en el petróleo. HC = hidrocarburos. ....	5
Figura 2. Ataque inicial de compuestos xenobióticos por bacterias mediada por oxigenasas. (A) Reacción enzimática involucrada en el proceso de degradación de hidrocarburos alifáticos. (B) Reacción enzimática involucrada en el proceso de degradación de hidrocarburos aromáticos. La dioxigenasa incorpora dos átomos de oxígeno en el sustrato. ....	13
Figura 3. Ataque inicial de compuestos xenobióticos por hongos no ligninolíticos mediada por la enzima monooxigenasa Citocromo P-450 sobre hidrocarburos aromáticos. ....	13
Figura 4. Mecanismo propuesto de degradación de hidrocarburos poliaromáticos por <i>Pleurotus ostreatus</i> vía enzimas ligninolíticas. ....	14
Figura 5. Métodos de inmovilización más comunes. ....	32
Figura 6. Sistema de enriquecimiento secuencial para el aislamiento de microorganismos degradadores de hidrocarburos a partir de granos de café previamente colonizado. ....	53
Figura 7. Diluciones seriadas para el aislamiento y recuento de microorganismos degradadores de hidrocarburos a partir de un inóculo obtenido a partir de ciclos de enriquecimiento secuencial. ....	54
Figura 8. Corte transversal de dos variedades del fruto de la fibra de estropajo <i>Luffa cylindrica</i> . ....	57
Figura 9. <i>Aspergillus niger</i> . 7a. Anverso de un cultivo de <i>A. niger</i> en medio Papa-Dextrosa-Agar de 7 días. 7b. Micrografía de <i>A. niger</i> mostrando las estructuras reproductoras asexuales (100X). ....	62
Figura 10. Anverso de un cultivo de <i>Fusarium solani</i> en medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA) de 7 días. ....	63
Figura 11. <i>Fusarium solani</i> . 9a. Micrografía de <i>F. solani</i> mostrando las estructuras reproductoras asexuales (100X). 9b. Macroconidios de <i>F. solani</i> con múltiples septos (100X). 9c. Fiálides solitarias largas productoras de microconidios (100X). ....	63
Figura 12. Anverso de un cultivo de <i>Fusarium oxysporum</i> en medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA) de 7 días. ...	64
Figura 13. <i>Fusarium oxysporum</i> . 11a. Micromorfología de una colonia de <i>F. oxysporum</i> mostrando las estructuras reproductoras asexuales (100X). Figura 11b. Micromorfología de una colonia de <i>F. oxysporum</i> destacando las fiálides productoras de microconidios (100X). ....	64
Figura 14. <i>Candida orthopsilosis</i> . 12a. Morfología colonial de <i>C. orthopsilosis</i> en medio Yeast-Mold (YM) a las 72 h. 12b. Morfología celular de <i>C. orthopsilosis</i> (40X). ....	65
Figura 15. <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> . 13a. Morfología colonial de <i>R. mucilaginosa</i> en medio Levadura-Peptona-Glucosa (YPG) a las 48 h (40X). 13b. Morfología celular de <i>R. mucilaginosa</i> (40X). ....	66
Figura 16. <i>Klebsiella variicola</i> . 14a. Morfología colonial de <i>K. variicola</i> en Agar Nutritivo (AN) a las 48 h (100X). 14b. Morfología celular de <i>K. variicola</i> (100X). ....	67
Figura 17. <i>Pseudomonas putida</i> . 15a. Morfología colonial de <i>P. putida</i> en Agar Nutritivo (AN) de 48 h. 15b. Morfología celular de <i>P. putida</i> (100X). ....	68
Figura 18. Fibras vegetales empleadas como soporte para degradar petróleo crudo. 16a. Dos variedades del fruto de <i>L. cylindric</i> . ....	93
Figura 19. Degradación de petróleo crudo por microorganismos asociados al grano de café inmovilizados en fibras vegetales a las 3 semanas de incubación. ....	95
Figura 20. Fotografías tomadas desde un estereoscopio de las fibras vegetales empleadas como soporte para inmovilizar a microorganismos asociados al grano de café para degradar petróleo crudo. ....	96
Figura 21. Micrografía electrónica de barrido mostrando la biopelícula de los microorganismos asociados al grano de café crecidos sobre la superficie de la fibra de <i>Luffa cylindrica 1</i> en cultivos en agua de mar a las 72 h de incubación. ....	105

## Índice de Ecuaciones

---

Ecuación 1. Reacción de Fenton .....	14
Ecuación 2. Reacción catalizada por la enzima glucosa oxidasa. ....	50
Ecuación 3. Reacción del sistema acoplado Peroxidasa /ABTS para la cuantificación de la enzima glucosa oxidasa .....	50
Ecuación 4. Reacción catalizada por la enzima galactosa oxidasa. ....	51
Ecuación 5. Reacción catalizada por la enzima galactosa oxidasa sobre la D-galactosa. ....	51
Ecuación 6. Reacción del sistema acoplado Peroxidasa /ABTS para la cuantificación de la enzima galactosa oxidasa .....	51
Ecuación 7. Ecuación para calcular las unidades formadoras de colonias. ....	54

## Resumen

---

En este trabajo se aisló a los microorganismos del grano verde de café tolerantes a diesel y se evaluó el potencial y el efecto de inmovilizarlos en la fibra vegetal (*Luffa cylindrica*) para degradar hidrocarburos en ambientes acuáticos. Se utilizó al fenantreno como modelo de hidrocarburo poliaromático, los experimentos de degradación se realizaron en agua y en agua de mar proveniente del puerto de Santa Cruz, Oaxaca.

Se sometió a los microorganismos del grano verde de café a diversas condiciones de cultivo combinadas usando un diseño experimental Plackett-Burman para determinar su efecto en la degradación de fenantreno a los 4 y 9 días de incubación. La degradación del contaminante mostró un efecto significativo ( $\alpha < 0.05$ ) a baja concentración de  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $R^2 = 0.95$ ;  $\text{CV} = 24.97$ ). Dos de las condiciones evaluadas (T5 y T8) mostraron una reducción del 89.33% y 70.18%, desde una concentración inicial de 180 mg/L en el día 9.

Se aislaron siete microorganismos tolerantes a diesel del grano verde de café, 3 hongos filamentosos (*Aspergillus niger*, *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum*), 2 levaduras (*Candida orthopsilosis* y *Rhodotorula mucilaginosa*) y dos bacterias (*Pseudomonas putida* y *Klebsiella variicola*). Las mejores condiciones para producir el inóculo inicial utilizado en los experimentos de degradación, fue un tamaño de partícula del grano de café de 0.42 a 0.86 mm y una humedad del 40% de la capacidad de retención del agua del grano verde de café.

De los microorganismos aislados, solamente *C. orthopsilosis* y *F. solani* fueron capaces de crecer en placas Petri en un medio mineral mínimo (Bushnell-Haas) con diesel como única fuente de carbono y en cultivo líquido con fenantreno (50 mg/L) como fuente de carbono. Ambos microorganismos mostraron un crecimiento acelerado ( $\mu\text{m}=0.0108$  mg/mL/h para *C. orthopsilosis* y  $\mu\text{m}=2.0580$  mg/mL/h para *F. solani*), con fase de latencia corta o sin ella.

Como soportes de inmovilización se emplearon dos variedades de la fibra vegetal *Luffa cylindrica*. La variedad 1 promovió una mayor adherencia de microorganismos que la variedad 2, tanto en cultivos en agua destilada como en cultivos en agua de mar. Los análisis por espectroscopía en el infrarrojo cercano indicaron que no hubo diferencias significativas ( $1-\alpha=0.95$ ) en la composición química entre las dos fibras vegetales, por lo que es posible que el mayor tamaño de poro sea el factor que más incide en la adherencia de los microorganismos al soporte. Los microorganismos del grano verde de café fueron capaces de crecer en agua de mar y de formar biopelículas en la fibra

vegetal. El agua de mar promovió una mayor adherencia de los microorganismos al soporte que el agua destilada.

En los experimentos de degradación de fenantreno sin glucosa como fuente primaria de carbono, ni la aireación ni el tiempo de incubación tuvieron un efecto positivo en la remoción del contaminante por parte de los microorganismos del grano verde de café. Sin embargo, la adición de glucosa (6 g/L) favoreció la remoción cometabólica del contaminante en los cultivos con células libres en agua destilada inoculados con *F. solani* y con el cultivo mixto del grano verde de café, pero no tuvo un efecto favorable en cultivos con células inmovilizadas. La inmovilización de los microorganismos en la fibra vegetal no mejoró la remoción del contaminante, siendo mayor la degradación biológica del fenantreno en los cultivos con células libres.

En los cultivos en agua de mar con glucosa (6 g/L) hubo mayor remoción biológica tanto en los cultivos con células en suspensión como con células inmovilizadas. La inmovilización de las células en agua de mar favoreció la remoción del contaminante en un 7% con respecto a los cultivos con células en suspensión.

El cultivo mixto del grano verde de café fue capaz de crecer en agua de mar y de formar biopelículas en la fibra de lufa. Sin embargo, sus mecanismos enzimáticos no están tan especializados como los de otros para metabolizar altas concentraciones del contaminante. En términos generales, la adición de glucosa favorece la degradación cometabólica del fenantreno en cultivos con células inmovilizadas; mientras que la inmovilización de los microorganismos, únicamente tiene un efecto significativo en los cultivos en agua de mar.

Sobre la base de lo anterior se concluye que los microorganismos asociados al grano de café no cuentan con el potencial necesario para degradar altas concentraciones de fenantreno en ambientes acuáticos.

## Abstract

---

In this paper the effect of immobilizing microorganisms of green coffee bean in a vegetable fiber to bioremediate salt water contaminated with fenanthreno was evaluated. Diesel was used to isolate green coffee bean hydrocarbon-tolerant microorganisms, while phenanthrene was used as a model of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in degradation experiments. Experiments were performed in distilled water and in seawater from the port of Santa Cruz, Oaxaca.

The microorganisms of green coffee bean were tested at day 4 and 9 to degrade phenanthrene under diverse combined culture conditions using a Plackett-Burman experimental design. The degradation of the pollutant showed a significant ( $\alpha < 0.05$ ) effect at low concentration of  $\text{NaNO}_3$  and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $R^2 = 0.95$ ;  $\text{CV} = 24.97$ ). Two of the tested conditions (T5 and T8) showed a reduction of 89.33% and 70.18% of phenanthrene from an initial concentration of 180 mg/L at day 9.

Seven diesel-tolerant microorganisms, 3 filaments fungi (*Aspergillus niger*, *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum*), 2 yeast (*Candida orthopsilosis* and *Rhodotorula mucilaginosa*) and two bacteria (*Pseudomonas putida* and *Klebsiella variicola*) were isolated. The best conditions to produce the initial inoculum used in the degradation experiments were, green coffee bean with a particle size from 0.42 to 0.86 mm and a moisture content of 40% of the water holding capacity of green coffee bean.

From the seven microorganisms isolated, only *C. orthopsilosis* and *F. solani* were able to grow in Petri dishes in minimum mineral medium (Bushnell-Haas) with diesel as the sole carbon source and phenanthrene (50 mg/L) as a carbon source in liquid culture. Both microorganisms showed an accelerated growth ( $\mu\text{m}=0.0108$  mg/mL/h for *C. orthopsilosis* and  $\mu\text{m}=2.0580$  mg/mL/h for *F. solani*), with or without a short latency phase.

Two varieties of loofha sponge (*Luffa cylindrica*) were used as immobilization carriers. The first variety promoted greater adhesion of microorganisms than variety 2, both in distilled water cultures as well as in seawater cultures. Spectroscopic analysis in the near infrared indicated no significant differences ( $1-\alpha=0.95$ ) in chemical composition between the two loofha fibers; so it is possible that the larger pore size is the most important factor that affects the adherence of microorganisms to the carrier. Microorganisms of green coffee bean were able to grow in seawater and form biofilms on the vegetable fiber. Seawater promotes greater adherence of microorganisms to the support than distilled water.

Regarding phenanthrene degradation assays without glucose, neither aeration or incubation time improved phenanthrene removal by green coffee bean microorganisms. However, the addition of glucose (6g/L) favored cometabolic pollutant removal in distilled water cultures inoculated with *F. solani* and with the mixed culture of green coffee bean, but did not have a favorable effect in cultures with immobilized cells. Immobilization of microorganisms in loofha fiber did not improve pollutant removal, thus, the most efficient biological degradation of phenanthrene was achieved by free cells.

In seawater cultures the addition of glucose (6 g/L) as primary carbon source, improved biological removal in cultures with free cells as well as with immobilized cells. In seawater cultures the immobilization of cells improved a 7% pollutant removal compared to cultures with cells in suspension.

The mixed culture of green coffee bean was able to grow in seawater and to form biofilms in the loofah fiber. However, their enzymatic mechanisms are not as specialized as those of others to metabolize high concentrations of the pollutant. The addition of glucose promotes the cometabolic degradation of phenanthrene in cultures with immobilized cells; while the immobilization of microorganisms, only has a significant effect in seawater cultures.

On the basis of the above, it is therefore concluded that microorganisms of green coffee beans do not have the potential to degrade high concentrations of phenanthrene in aquatic environments.

# 1. INTRODUCCIÓN

---

En nuestras sociedades el petróleo y sus derivados son imprescindibles como fuente de energía y para la elaboración de múltiples productos de la industria plástica, química, médica, textil y agrícola, entre otras. Alrededor del 0.1 al 0.2% de la producción mundial de petróleo es vertida al mar debido a derrames accidentales o descargas directas durante los procesos de exploración, extracción y transporte; es decir, más de 3 millones de toneladas terminan contaminando las aguas cada año, lo que provoca daños en los ecosistemas marinos (Echarri, 1998). Estos contaminantes son insolubles en agua, lo que los hace difíciles de degradar.

Entre las principales tecnologías empleadas para remediar los sistemas contaminados con hidrocarburos se encuentran las físicas, químicas y biológicas. Sin embargo, debido a las consecuencias negativas de los dos primeros métodos y a su alto costo, se está dirigiendo la atención al empleo de alternativas biológicas (Morra, 1996; Okoh, 2006). Los procesos de degradación microbiana de compuestos químicos existen de manera natural y han ocurrido siempre; sin embargo, es a partir del derrame del Exxon Valdez en 1989 que se han realizado intentos alternativos para aprovechar las capacidades metabólicas de los microorganismos para degradar hidrocarburos por procesos métodos naturales, con el objetivo de realizar aplicaciones tecnológicas a gran escala para una restauración ambiental efectiva y costeable (Morra, 1996).

Por lo general los microorganismos poseen la habilidad enzimática para metabolizar algunos de los componentes del petróleo crudo, por lo que se requiere de consorcios microbianos conformados por diferentes especies para degradarlo de manera significativa (Westlake, 1982). El empleo de consorcios o cultivos mixtos posee ciertas ventajas sobre la bioestimulación, sobre todo en los casos en donde la toxicidad del contaminante es muy elevada o no se dispone de microorganismos endógenos con las capacidades enzimáticas adecuadas, tanto en cantidad como en calidad (Okoh, 2006).

El grupo de trabajo del laboratorio de Compuestos Xenbióticos del CINVESTAV, ha realizado investigaciones sobre la aplicación del grano de café y de los microorganismos asociados a este para biorremediar suelos contaminados con plaguicidas, hidrocarburos y otros compuestos recalcitrantes (Roldán-Martín, 2006; Ramírez-Castillo, 2009; Zúñiga-Silva, 2009; Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2011). El grano de café es un material rico en nutrientes que promueve el crecimiento de una gran variedad de microorganismos. En el inóculo del grano verde de café se han identificado diversas

poblaciones de microorganismos capaces de degradar compuestos recalcitrantes. Entre las bacterias se encuentran: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Flavimonas oryzihabitans* y *Morganella morganii* (Barragán-Huerta *et al.*, 2007). También se han aislado bacterias productoras de biosurfactantes como *Bacillus cereus* (Velázquez-Aradillas *et al.*, 2010) y hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Absidia* con habilidad de degradar hidrocarburos (Zúñiga-Silva, 2009).

El empleo del grano de café en combinación con agentes texturizantes (residuos lignocelulósicos como paja, bagazo de caña y fibra de agave) en los procesos de biorremediación de suelo y agua, ha mostrado que es posible reducir altas concentraciones de hidrocarburos de fracción media (HFM), hidrocarburos fracción pesada (HFP) y de hidrocarburos poliaromáticos (HPAS) (Roldán-Martín *et al.*, 2007; Zúñiga-Silva, 2009). La tecnología desarrollada (Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2011) ha sido aplicada a escala comercial en suelo, subsuelo y mantos acuíferos someros contaminados con diesel y grasas, en varios contratos con PEMEX-Refinación (Rodríguez-Vázquez, 2008) y Ferrocarriles Nacionales de México (Rodríguez-Vázquez, 2010; Rodríguez-Vázquez, 2011); mientras que a nivel laboratorio ha sido empleada en la biorremediación de aguas contaminadas con benceno y metil ter-butil éter (Ramírez-Castillo, 2009) y en agua salada contaminada con diesel (Bolaños-García, 2011), obteniéndose en todos los casos altos porcentajes de remoción de los contaminantes.

Cuando se emplea la bioaumentación como estrategia de biorremediación es necesario proporcionar a los microorganismos exógenos condiciones que minimicen el impacto de los diferentes factores bióticos y abióticos, coadyuvando así a su establecimiento y supervivencia. Una de las técnicas desarrolladas para este fin es la inmovilización de la biomasa activa. La inmovilización de microorganismos presenta ciertas ventajas sobre su contraparte libre, como son: incremento en la actividad catalítica, formación de microambientes, menor susceptibilidad de los microorganismos a factores abióticos y mayor resistencia a concentraciones altas de contaminantes (O'Reilly y Crawford, 1989).

Además de las capacidades metabólicas de los microorganismos, el éxito de la biorremediación depende del conocimiento de los factores que limitan o favorecen la degradación de las sustancias químicas contaminantes, en especial de mezclas complejas, como lo es el petróleo crudo. Por lo que es necesario llevar a cabo estudios más detallados de la actividad metabólica y de los factores que facilitan la supervivencia y el establecimiento de los microorganismos, así como de las condiciones ambientales que favorecen las tasas de degradación de los contaminantes para estar en la



posibilidad de desarrollar tecnologías de tratamiento más eficientes que puedan ser aplicadas exitosamente.

En este trabajo se investigó el potencial de los microorganismos presentes en el grano verde de café para degradar hidrocarburos en ambientes acuáticos. Se utilizó al fenantreno (Phe) como hidrocarburo modelo y los experimentos se realizaron en agua destilada y en agua de mar. Los microorganismos se inmovilizaron en la fibra vegetal *Luffa cylindrica* mejor conocida como estropajo.

## 2. MARCO TEÓRICO

---

### 2.1 Hidrocarburos del petróleo

Los hidrocarburos del petróleo son productos naturales derivados de residuos de plantas y animales, establecidos entre 180 y 85 millones de años atrás, que fueron sometidos a determinadas condiciones de temperatura y presión y a la acción de bacterias anaerobias. Como consecuencia de su origen, condiciones de evolución y antigüedad, los crudos difieren en su composición (Figura 1), por lo que sus características físico-químicas varían e inciden además en los procesos de biorremediación.

En un crudo están presentes, en mayor o menor proporción, hidrocarburos parafínicos, nafténicos, oleofínicos, aromáticos y asfálticos. Las parafinas son los hidrocarburos más ricos en hidrógeno y por tanto, relativamente estables. Generalmente son líquidas, pero también se pueden encontrar en estado gaseoso o sólido. De las parafinas livianas se obtienen aceites para uso doméstico que resisten el calor y no producen humo al quemarse (Marroquín, 2007).

Los naftenos o cicloalcanos son hidrocarburos saturados, lo que hace que sean resistentes a los cambios, incluyendo la oxidación. Se encuentran en todas las fracciones del crudo, excepto en las más ligeras. Generalmente contienen gran proporción de fracciones volátiles que se evaporan fácilmente (Marroquín, 2007).

Las oleofinas son hidrocarburos insaturados muy reactivos que se combinan fácilmente con el hidrógeno, oxígeno, cloro y azufre. Esto causa que no sean deseados en los combustibles; sin embargo, son apreciados en la industria del plástico.

Por su parte, los HPAs son compuestos aromáticos no saturados que actúan como saturados. Son deseables en los combustibles, debido a sus propiedades antidetonantes (Marroquín, 2007). Son empleados en la producción de plásticos, colorantes e insecticidas y algunos son dañinos a la salud y carcinogénicos (Cerniglia, 1993; Han *et al.*, 2004). Los asfaltenos y las resinas son hidrocarburos polares que conforman la fracción pesada del crudo. Su estructura general consiste en un núcleo aromático con cadenas alquílicas laterales y átomos de nitrógeno, azufre u oxígeno, incorporados en las estructuras cíclicas formando compuestos heterocíclicos (Fahnestock *et al.*, 1998); son solubles en tolueno y benceno e insolubles n-alcenos de bajo peso molecular. Los asfaltenos son partículas sólidas semicristalinas de color café o negro de alto peso molecular (1,000 a 5,0000

kg/kgmol) que contienen anillos condensados de HPAs; mientras que las resinas son de menor peso molecular (250 a 1000 kg/kgmol) y poseen una relación más alta de cadenas alifáticas/anillos aromáticos con respecto a los asfaltenos. La diferencia fundamental entre las resinas y los asfaltenos radica en que éstas son solubles en algunas parafinas normales, como el n-pentano y n-heptano, mientras que los asfaltenos no (Fahnestock *et al.*, 1998; Marroquín, 2007).

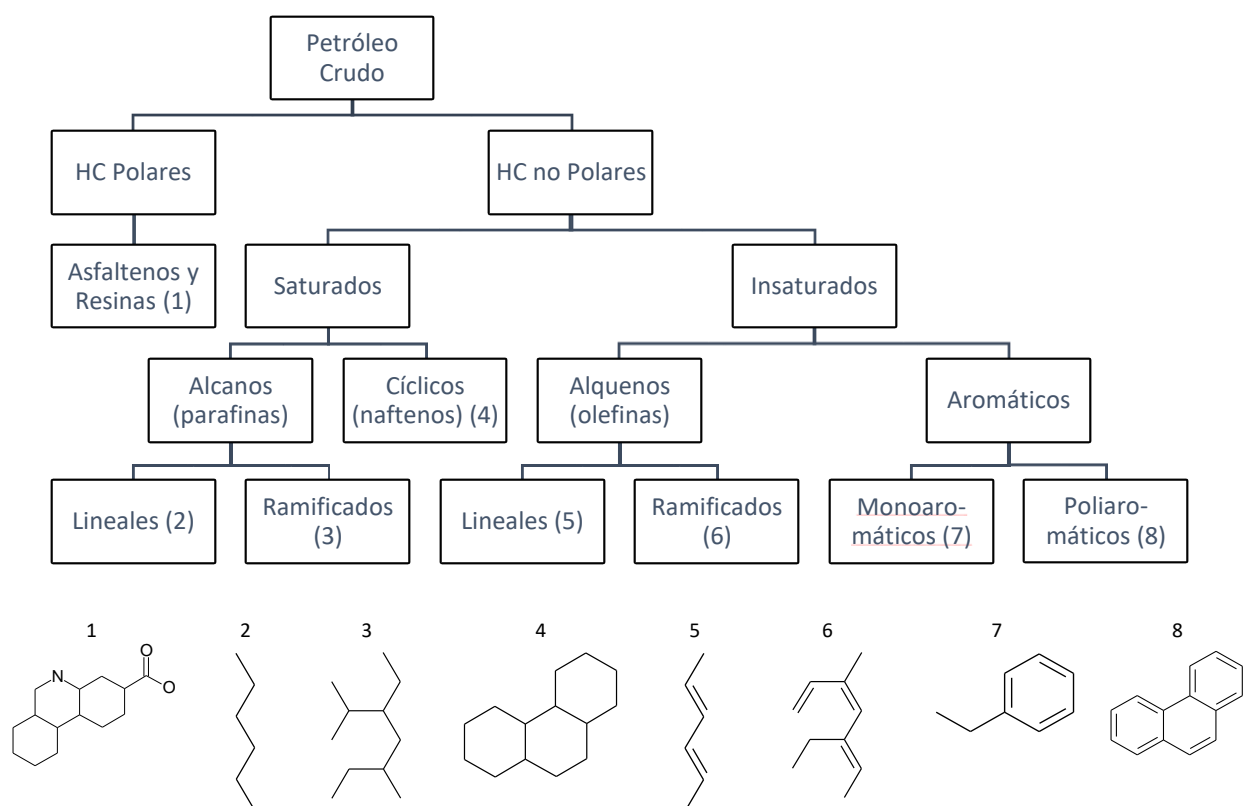


Figura 1. Tipos de compuestos orgánicos presentes en el petróleo. HC = hidrocarburos.  
Fuente: Fahnestock *et al.*, 1998.

Los productos refinados del petróleo, como los combustibles, contienen principalmente hidrocarburos saturados e insaturados. La gasolina, por ejemplo, contiene de 4 a 8% de alcanos, de 2 a 5% de alquenos, de 25 a 40% de isoalcanos, de 3 a 7% de cicloalcanos, de 1 a 4% de cicloalquenos y de 20 a 50% de hidrocarburos aromáticos. Por su parte, el diesel contiene principalmente hidrocarburos de 10 a 19 átomos de carbono, siendo su composición aproximada la siguiente: 64% de hidrocarburos alifáticos, 1 a 2% de hidrocarburos olefinicos y 35% de hidrocarburos aromáticos (Fahnestock *et al.*, 1998).

Los hidrocarburos del petróleo son insolubles en agua, lo que los hace persistentes. El proceso de biodegradación del petróleo es complejo y depende de la naturaleza, cantidad de hidrocarburos presentes y de factores bióticos y abióticos entre los que destacan: la presencia de microorganismos con capacidades metabólicas apropiadas, pH, temperatura, nivel de aceptores y donadores de electrones (oxígeno y materia orgánica), nivel de nutrientes (N, P y K), grado de envejecimiento y asociación con otros contaminantes (Bamforth y Singleton, 2005). En términos generales a mayor masa molecular e índice de aromaticidad, menor solubilidad y biodisponibilidad a los microorganismos y por ende, menor tasa de degradación (Bamforth y Singleton, 2005).

### **2.1.1 Hidrocarburos poliaromáticos**

Los HPAs están compuestos por dos o más anillos bencénicos fusionados. Pueden existir en más de 100 combinaciones diferentes, pero los más comunes son tratados como un grupo de 15. Se pueden originar de fuentes naturales (biogénico o geoquímico) y antropogénicas. Se forman principalmente como resultado de procesos pirolíticos, en especial de la combustión incompleta de materiales orgánicos, tales como el procesamiento del carbón, quema de petróleo crudo y sus derivados, quema de llantas y biomasa, combustión del gas natural, tráfico vehicular, humo del tabaco y quema de basura, entre otros (ATSDR, 1990). Debido al impacto ambiental que las fuentes antropogénicas producen son el foco de muchos programas de biorremediación (Bamforth y Singleton, 2005; Cerniglia, 1993; Rodríguez, 2005).

Algunos HPAs como el benzopireno son carcinogénicos y se cree que también pueden ocasionar mutaciones y producir alteraciones funcionales durante el periodo embrionario (Juhász y Naidu, 2000; Yan *et al.*, 2004). Los HPAs son de importancia ambiental y toxicológica, debido a que no se queman con facilidad y pueden persistir en el ambiente por periodos prolongados de tiempo. Aunque en términos generales los HPAs son poco solubles en agua y altamente lipofílicos, su comportamiento varía de forma individual. Cuando están disueltos en agua o adsorbidos a materia particulada pueden sufrir foto-degradación si están expuestos a luz ultravioleta proveniente de la radiación solar; mientras que la mayoría no se degradan fácilmente en el agua y al evaporarse son transportados a grandes distancias. En la atmósfera, pueden reaccionar con otros contaminantes como ozono, óxidos de nitrógeno y dióxido de azufre, produciendo hidrocarburos nitroaromáticos (Nitro-HPAs) y ácido sulfónico (Kamens *et al.*, 1994).

Las familias más abundantes de HPAs del petróleo tienen dos o tres anillos fusionados con uno a cuatro sustituyentes alquilo. La toxicidad aumenta conforme incrementa el número de estos sustituyentes (Irwin *et al.*, 1997). Algunos estudios concluyen que la toxicidad del petróleo crudo está en función de las familias de HPA con dos y tres anillos (Anderson *et al.*, 1974) de ahí que esos compuestos se empleen como hidrocarburos modelos en estudios de biorremediación.

### **Propiedades físico-químicas del fenantreno**

El Phe es un hidrocarburo de bajo peso molecular formado por tres anillos fusionados en un modelo angular, posee dos regiones principales llamadas “región Bahía” y “región K” y está reconocido como un contaminante prioritario por la Agencia de Protección de Estados Unidos (EPA). Se encuentra en altas concentraciones en productos refinados del petróleo crudo. La “región Bahía” se forma entre los carbonos 4 y 5, mientras que la “región K” se forma entre los carbonos 9 y 10. La importancia de estas regiones estriba en el hecho de que el ataque microbiológico es específico en alguna de ellas, dependiendo del microorganismo y de la enzima producida (Mrozik *et al.*, 2003; Salloum *et al.*, 2002; Waigi *et al.*, 2015). En la [Tabla 1](#) se presentan las principales propiedades físicas y químicas del fenantreno.

Tabla 1. Propiedades físico-químicas del fenantreno.

Parámetro	Valor
Peso molecular	178.2292 g/mol
Densidad	1.179 g/cm <sup>3</sup> a 25°C <sup>a</sup>
Punto de Fusión	97-101°C <sup>b</sup>
Punto de Ebullición	338-340°C <sup>b</sup>
Solubilidad en agua	0.42 mg/L a 8.5°C; 1.6 mg/L a 15°C; 0.82 mg/L a 21°C; 1.3 mg/L a 30°C <sup>c</sup> 0.994 a 1.15 mg/L de 20-25°C <sup>d</sup>
Solubilidad en agua de mar	0.6 mg/L a 22°C <sup>c</sup>
Presión de vapor	1.21x10 <sup>-4</sup> mm Hg a 25°C <sup>e</sup>
Constante de la Ley de Henry de volatilidad 20°C	2.3x10 <sup>-5</sup> – 2.56 x10 <sup>-5</sup> atm·m <sup>3</sup> /mol <sup>g</sup>
Coefficiente de Adsorción de Carbono Orgánico (Log K <sub>oc</sub> )	Log K <sub>oc</sub> = 4.39 – 4.67 (K <sub>oc</sub> =24,547.09 – 46,773.51) <sup>f</sup>
Coefficiente de Partición Octanol-Agua (Log K <sub>ow</sub> )	Log K <sub>ow</sub> = 4.46 (K <sub>ow</sub> =28,840.31) <sup>h</sup> Log K <sub>ow</sub> = 4.57 (K <sub>ow</sub> =37,153.52) <sup>i</sup>

<sup>a</sup> O'Neil, 2006  
<sup>b</sup> Lide, 2007  
<sup>c</sup> Verschueren, 2001

<sup>d</sup> Schwarz, 1977  
<sup>e</sup> Wasik *et al.*, 1983  
<sup>f</sup> Salloum *et al.*, 2002

<sup>g</sup> Sander, 2015  
<sup>h</sup> Hansch Hoekman, 1995  
<sup>i</sup> Sangster, 1989

## 2.2 Contaminación por hidrocarburos

La contaminación ambiental puede surgir tanto de procesos naturales como antropogénicos; sin embargo, la contaminación por hidrocarburos generalmente está asociada a derrames de petróleo. Los hidrocarburos pueden ingresar al ambiente como resultado de fugas, derrames accidentales y descargas directas durante los procesos de extracción, refinamiento, almacenamiento, transporte y distribución. Se estima que por diferentes causas llegan anualmente al ambiente marino aproximadamente 3.2 millones de toneladas de hidrocarburos; 15% de este volumen es producto de accidentes en buques, tanques, reventones de tuberías o explosiones en plataformas petrolíferas. No deben subestimarse los derrames de las refinerías próximas al litoral y los que tienen lugar en instalaciones portuarias destinadas a la carga y descarga de los buques (Echarri, 1998), pues estos residuos convierten el mar en un depósito de sustancias contaminantes.

Cuando se produce un derrame de petróleo en el mar, debido a las olas y a la turbulencia en la superficie del océano, la mancha de aceite se extiende en una superficie cada vez mayor hasta llegar a formar una capa muy extensa, de un espesor muy delgado. Se estima que en el transcurso de 1.5 horas, 1 m<sup>3</sup> de petróleo puede llegar a formar una mancha de 100 m de diámetro y 0.1 mm de espesor. Una gran parte del petróleo se evapora (50%) y es descompuesto por foto-oxidación en la atmósfera (Burwood y Speers, 1974; Lehr, 2001). Los alcanos alifáticos de cadena corta (con 12 átomos de carbono o menos) y los monoaromáticos más ligeros (benceno, tolueno, xilenos) se evaporan con relativa facilidad. Bajo la luz del sol, el petróleo expuesto en la superficie sufre modificaciones fotoquímicas, resultando en un aumento de la fracción polar.

Las olas y la turbulencia del mar pueden ocasionar que la mancha negra se descomponga en gotas de diferentes tamaños. Algunas de las gotas más pequeñas permanecerán suspendidas en el agua de mar, mientras que las más grandes tenderán a subir de nuevo a la superficie, donde pueden fusionarse con otras gotas para reformar la mancha o dispersarse para formar una película muy delgada. Si las gotas se adhieren a materia orgánica en suspensión, estas pueden depositarse en el fondo. El petróleo así dispersado tiene una mayor área superficial, lo que fomenta otros procesos naturales: una parte sufre foto-oxidación, otra parte se disuelve en el agua, otra parte es biodegradado en la columna de agua, y lo que queda puede formar emulsiones (Burwood y Speers, 1974; Lehr, 2001).

Desde la perspectiva de pérdida de masa, la disolución es un proceso menos importante que la evaporación. Sin embargo, debido a que algunas fracciones del petróleo crudo, como los

compuestos aromáticos ligeros con dos a tres anillos, son extremadamente tóxicos para los organismos marinos (incluyendo a los microorganismos capaces de degradar otras fracciones del petróleo), el impacto ecológico en el ambiente marino es mayor que las consideraciones de balance de masas (U.S. Congress OTA, 1991).

Las emulsiones agua-en-aceite se forman cuando el oleaje fuerte hace que el agua quede atrapada en el interior del aceite. Tienen una consistencia gelatinosa y se puede convertir en bolas de alquitrán densas y semisólidas, con aspecto asfáltico, razón por la cual es denominada frecuentemente mousse de chocolate. Este mousse puede persistir en el ambiente durante meses o años y retarda otros procesos de meteorización. Las emulsiones aceite-en-agua se hunden y desaparecen de la superficie, dando la falsa impresión de que la amenaza contra el ambiente ha terminado (Burwood y Speers, 1974; Lehr, 2001).

Los procesos de meteorización ocurren de manera diferencial en ambientes dulceacuícolas. En cuerpos de agua lénticos (lagos, estanques, pantanos y embalses), en donde el movimiento de las aguas es escaso, el crudo tiende a acumularse durante largos periodos de tiempo; mientras que en ambientes lóticos (ríos y arroyos), el petróleo tiende a acumularse en las plantas y hierbas que crecen en las orillas. El petróleo también puede interactuar con los sedimentos del fondo de los cuerpos de agua, afectando a los organismos que viven en o se alimentan de estos.

Los efectos del petróleo sobre los ecosistemas acuáticos son diversos y dependen de varios factores entre los que destacan; composición del petróleo vertido, cantidad y duración de la descarga, época del año, distancia del sitio contaminado con la costa (u orilla) y propiedades de esta (rocosa, arenosa, manglar, estuario o marisma), profundidad del cuerpo receptor, tipo y cantidad de microorganismos degradadores de petróleo presentes, condiciones ambientales del sitio afectado, condiciones atmosféricas prevalecientes durante el derrame, temperatura media del agua y corrientes.

Desde la década de 1940 hasta el año 2010 han ocurrido derrames de petróleo alrededor del mundo. Los dos derrames accidentales más grandes han tenido lugar en el Golfo de México con la perforación del pozo Ixtoc-I y la explosión del pozo Macondo de la plataforma Deepwater Horizons. En la [Tabla 2](#) se presentan las principales características de algunos de los derrames de petróleo a nivel mundial ocurridos en las últimas 50 décadas. Las causas de los derrames son diversas, así como el volumen de petróleo vertido al mar. Entre los métodos de limpieza empleados destacan la

inyección de agua fría y caliente a presión, incineración, adición de dispersantes, atenuación natural y biorremediación.

Tabla 2. Características de algunos de los derrames de petróleo de las últimas 50 décadas.

Derrame	Amoco Cadiz <sup>a</sup>	Ixtoc-I <sup>a</sup>	Exxon Valdez <sup>b</sup>	Prestige <sup>c,d</sup>	DeepWater Horizon <sup>b</sup>
<b>Naturaleza del incidente</b>	Encallamiento de un buque tanque	Derrame durante la perforación del Pozo	Encallamiento del buque y fractura de 11 tanques de carga	Hundimiento del petrolero por inundación de los tanques	Explosión del pozo Macondo de la plataforma
<b>Ubicación</b>	Costa de Bretona, Francia	Golfo de México	Prince William Sound, Alaska	Noroeste del litoral Español	Golfo de México
<b>Fecha</b>	Marzo, 1978	Junio 3 de 1979 a Marzo 20 de 1980	Marzo 24 de 1989	Noviembre 19 de 2002	Abril 20 a Julio 15 de 2010
<b>Área afectada</b>	322 km	2,800 km <sup>2</sup>	2,087 km de la costas insulares	18 playas de la costa de Galicia y litoral Cantábrico	6,475 Km <sup>2</sup>
<b>Tipo de petróleo</b>	Arabian Light e Iranian Light (~1:1)	Ixtoc-I Ligero	Alaskan North Slope Heavy Oil	Russian Heavy Oil	Light Louisiana Oil y grandes cantidades de metano.
<b>Volumen derramado</b>	223,000 ton	476,000 a 600,000 ton	37,000 ton	77,000 ton	779,000 ton
<b>Densidad (g/cm<sup>3</sup>)</b>	0.85	0.84		0.99	0.82 <sup>e</sup>
<b>Grado API</b>			29.0		35.2
<b>Tecnología(s) de limpieza empleada(s)</b>	Métodos físicos y químicos, natural y biorremediación	Incineración y uso de dispersantes químicos	Inyección de agua a presión y adición de fertilizantes	Inyección de agua a presión y biorremediación.	Uso extensivo dispersantes químicos e incineración
<b>Composición química (%)</b>					
Saturados	39	50		22	74 <sup>e</sup>
Aromáticos				50	16 <sup>e</sup>
Resinas y asfaltenos	27	18		30	10 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Marchand *et al.*, 1981.

<sup>b</sup> Atlas y Hazen, 2011.

<sup>c</sup> Viéitez, 2007.

<sup>d</sup> <http://csicprestige.iim.csic.es/informes/info01.pdf>

<sup>e</sup> Reddy *et al.*, 2012.



A pesar de los daños ecológicos y económicos causados por los derrames accidentales, el petróleo sigue siendo el combustible fósil que constituye la principal fuente de energía utilizada en el mundo y, según proyecciones realizadas por el Departamento de Energía de Estados Unidos (DOE, 2012), no se espera una reducción en su consumo en el mediano y largo plazo. En términos generales, el consumo de crudo a nivel mundial incrementó a lo largo del periodo comprendido entre 1980 al 2010, con ligeros decrementos entre los años: 1981 a 1983 y 2008 a 2009, lo que coincide con la crisis económica de América Latina y la crisis económica mundial (Gráfico 1) (DOE, 2012).

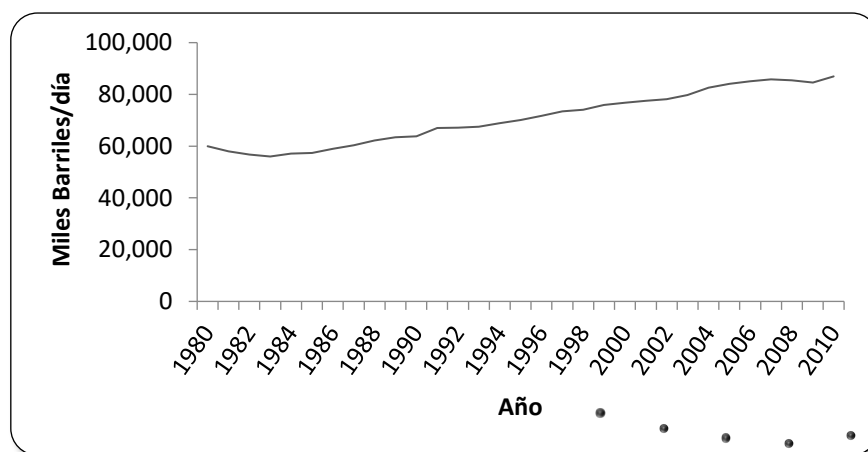


Gráfico 1. Consumo de petróleo crudo a nivel mundial por día.  
Fuente: (DOE, 2012).

## 2.3 Biodegradación de hidrocarburos

Los hidrocarburos del petróleo regularmente se escapan al ambiente marino de los yacimientos subterráneos y debido a que han estado presentes desde hace mucho tiempo, ha habido tiempo suficiente para que diversos microorganismos desarrollen la capacidad de utilizarlos como fuente de carbono y de energía para su crecimiento (U.S. Congress OTA, 1991; Atlas y Hazen, 2011), de manera que existe una gran cantidad de bacterias, arqueas y hongos que pueden degradar petróleo.

Al ser el crudo una mezcla compleja de compuestos orgánicos, se requieren microorganismos con capacidades metabólicas diferentes, razón por la cual diversos investigadores (U.S. Congress OTA, 1991; Canet *et al.*, 2001) sugieren el empleo de consorcios o cultivos mixtos de hongos y bacterias para su degradación, ya que muchas de estas especies coexisten en ecosistemas naturales y pueden actuar de manera independiente o conjunta para metabolizar los hidrocarburos. Entre más complejo sea la estructura del hidrocarburo, menor la tasa de degradación y mayor la posibilidad de acumular compuestos metabólicos parcialmente oxidados.

Las primeras etapas de la biodegradación del petróleo se caracterizan por la pérdida de las parafinas y de los aromáticos de bajo peso molecular. Los alcanos con cadenas lineales de hasta 44 átomos de carbono pueden ser metabolizados por los microorganismos. Los de 5 a 9 átomos (C<sub>5</sub>-C<sub>9</sub>), son degradados por algunos microorganismos, pero pueden ser tóxicos para otros. La presencia de estos alcanos a altas concentraciones, inhibe la biodegradación del resto de los compuestos, ya que actúan como potentes disolventes apolares que rompen la membrana lipídica de los microorganismos. Los alcanos ramificados son más resistentes a la biodegradación que los lineales, pero menos resistentes que los cicloalcanos. La tasa de degradación de los poliaromáticos es menor que la de los monoaromáticos. Los aromáticos con más de cinco anillos pueden persistir en el ambiente por largos periodos (U.S. Congress OTA, 1991). Conforme el petróleo es biodegradado hay un incremento en la resistencia de la mezcla residual a una posterior biodegradación. El petróleo crudo es más recalcitrante que el refinado y por lo mismo es más difícil su degradación completa y siempre deja algún residuo complejo (U.S. Congress OTA, 1991; Atlas, 1995).

### **2.3.1 Metabolismo de degradación**

La degradación aerobia inicial de hidrocarburos alifáticos y cíclicos requiere de oxígeno molecular. Existen fundamentalmente dos mecanismos para la degradación aerobia de los hidrocarburos, siendo la base general de estos, la activación e incorporación de oxígeno en la molécula del contaminante. Estas reacciones son mediadas principalmente por enzimas oxigenasas (monooxigenasas, monooxigenasas P-450 y dioxigenasas) y ligninolíticas (Fritsche y Hofrichter, 2008; Bamforth y Singleton, 2005). La reacción depende de la naturaleza del sustrato y del sistema enzimático propio de los microorganismos involucrados.

En el caso de las bacterias, el contaminante es traslocado al interior de la célula en donde la enzima monooxigenasa incorpora un átomo del oxígeno molecular al sustrato, el segundo átomo de oxígeno es reducido a H<sub>2</sub>O; mientras que las dioxigenasas oxidan las moléculas incorporando dos átomos de oxígeno en forma de hidroxilos ([Figura 2](#)) (Fritsche y Hofrichter, 2008; Das y Chandran, 2011). Ambas enzimas son dependientes de flavina, tienen como grupo prostético al flavin-adenin-dinucleótido (FAD) y utilizan directamente al NADH ó NADPH como cofactor o donador de electrones para reducir uno de los dos átomos de oxígeno (Karigar y Rao, 2011).

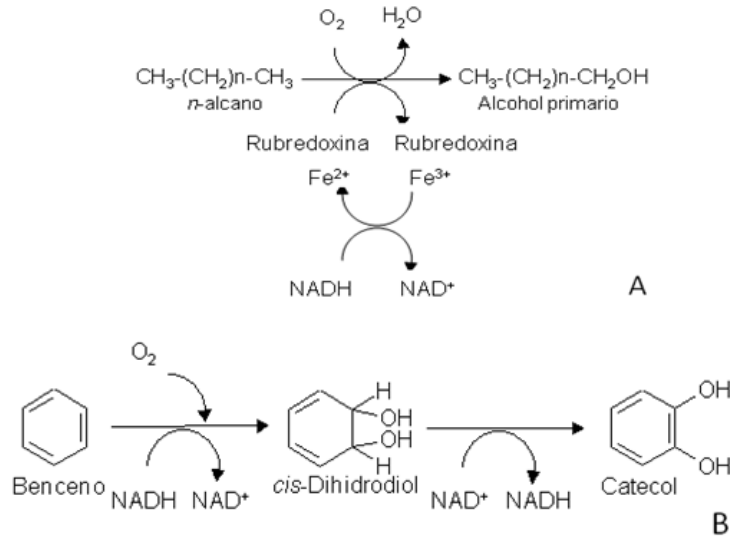


Figura 2. Ataque inicial de compuestos xenobióticos por bacterias mediada por oxigenasas. (A) Reacción enzimática involucrada en el proceso de degradación de hidrocarburos alifáticos. (B) Reacción enzimática involucrada en el proceso de degradación de hidrocarburos aromáticos. La dióxigenasa incorpora dos átomos de oxígeno en el sustrato. Fuente: Fritsche y Hofrichter, 2008.

Se ha reportado que los hongos no ligninolíticos realizan la oxidación de los hidrocarburos a través de monooxigenasas dependientes del citocromo P-450, dando lugar a alcoholes primarios u óxidos de areno (Figura 3) (Bamforth y Singleton, 2005; Fritsche y Hofrichter, 2008). A diferencia de las flavín-monooxigenasas, el ciclo catalítico de las monooxigenasas P-450 conlleva varias etapas sucesivas. La catálisis transcurre con el concurso tanto del citocromo P-450 reductasa dependiente de NADH, que suministra el electrón necesario para la reducción de  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$  como del citocromo b5 que canaliza un segundo electrón que permite reducir parcialmente a la molécula de oxígeno (Karigar y Rao, 2011).

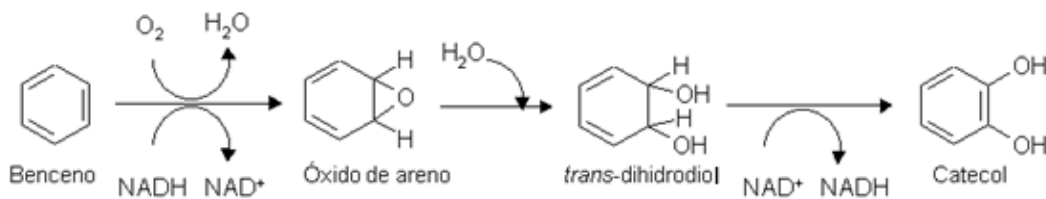


Figura 3. Ataque inicial de compuestos xenobióticos por hongos no ligninolíticos mediada por la enzima monooxigenasa Citocromo P-450 sobre hidrocarburos aromáticos. Fuente: Fritsche y Hofrichter, 2008.

Los alcanos son posteriormente convertidos a ácidos carboxílicos, los cuales son biodegradados vía la  $\beta$ -oxidación, que es la ruta metabólica central para la utilización de los ácidos grasos que conforman los lípidos, lo que da como resultado la formación de acetato que entra al ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Los hidrocarburos aromáticos generalmente son hidroxilados a dioles y convertidos posteriormente a catecoles, los cuales son subsecuentemente degradados a intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Atlas, 1995).

Los hongos y las bacterias forman intermediarios con diferente estereoquímica. Los hongos al igual que el sistema enzimático de los mamíferos, forma *trans*-dioles, mientras que las bacterias casi siempre forman *cis*-dioles (Figura 2 y Figura 3). Muchos *trans*-dioles son potentes carcinógenos, mientras que los *cis*-dioles no son biológicamente activos (Atlas, 1995).

Los hongos de la podredumbre blanca emplean una combinación de enzimas ligninolíticas extracelulares poco específicas (manganeso peroxidasa, lignina peroxidasa y lacasas) capaces de oxidar una gran variedad de sustratos (Figura 4) (Bamforth y Singleton, 2005).

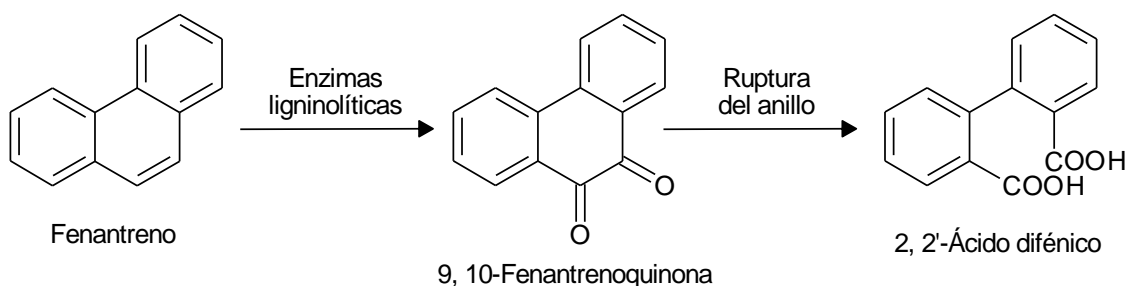
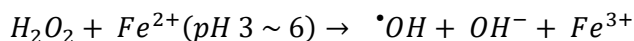


Figura 4. Mecanismo propuesto de degradación de hidrocarburos poliaromáticos por *Pleurotus ostreatus* vía enzimas ligninolíticas. Fuente: Bezalel *et al.*, 1997.

También hay evidencia de mecanismos alternativos de degradación de compuestos xenobióticos llevados a cabo tanto por hongos de la podredumbre de la madera como por hongos no ligninolíticos, a través de reacciones no enzimáticas basadas en la generación de radicales libres, como el hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) y el radical anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), capaces de degradar los contaminantes (Rabinovich *et al.*, 2004). Los radicales  $\cdot\text{OH}$ , con un alto potencial redox, son capaces de oxidar compuestos orgánicos contaminantes como el triclorofenol (Ahuja *et al.*, 2007) y el DDT (Izcapa-Treviño *et al.*, 2009) de forma muy similar a como ocurre por procesos fotoquímicos de oxidación avanzada (POA) (Gernjak *et al.*, 2003; Anotai *et al.*, 2006). Dentro de estos procesos se tiene la reacción de Fenton (Ecuación 1), en donde el radical  $\cdot\text{OH}$  es generado a través de la reducción del peróxido de hidrógeno por el ion ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (Jeong y Yoon, 2004).



Ecuación 1. Reacción de Fenton  
Fuente: Jeong y Yoon, 2004.

Aunque este mecanismo no es enzimático, se requiere de la presencia de enzimas oxidoreductasas extracelulares que suministren el peróxido de hidrógeno necesario al sistema. Entre estas enzimas

destacan la glucosa oxidasa, glioxal oxidasa, galactosa oxidasa, alcohol oxidasa y alcohol aril oxidasa (Rabinovich *et al.*, 2004; Ahuja *et al.*, 2007). Ahuja y colaboradores (2007) demostraron que mediante la reacción acoplada de la oxidación de la glucosa con una reacción tipo Fenton es posible la descloración del triclorofenol. Gracias al peróxido de hidrógeno y al ácido glucónico generados *in situ* durante la oxidación de la glucosa por la enzima glucosa oxidasa fue posible degradar el contaminante a un pH cercano a la neutralidad. Tanto la enzima glucosa oxidasa como el ion ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) fueron suministrados al sistema en solución. El ácido glucónico producido durante la oxidación de la glucosa actuó como agente quelante, evitando la formación y precipitación de hidróxido de hierro durante la reacción de Fenton a pH 6. Por su parte, el grupo de trabajo ha detectado la presencia de la glucosa oxidasa en cultivos de *Talaromyces stipitatus* durante la degradación de DDT (Acosta-Rubí, 2011) y la presencia de peróxido de hidrógeno durante cinéticas de degradación de plaguicidas (Izcapa-Treviño *et al.*, 2009).

### **2.3.2 Factores que limitan la degradación de hidrocarburos en ambientes acuáticos**

La composición del crudo es el factor más importante, debido a que determina la biodegradabilidad del mismo. Entre los factores físicos, la temperatura juega un papel muy importante, ya que afecta algunas propiedades del hidrocarburo (solubilidad, volatilidad, viscosidad, etc.), así como el metabolismo y diversidad de los microorganismos degradadores de éstos. Atlas (1975) encontró que, a bajas temperaturas, aumenta la viscosidad del crudo y disminuye la volatilidad de los hidrocarburos tóxicos de bajo peso molecular. La temperatura también afecta la solubilidad de los hidrocarburos y aunque la biodegradación puede llevarse a cabo dentro de un rango amplio, la tasa de biodegradación generalmente disminuye con el incremento de temperatura. Las mayores tasas de degradación en suelos se presentan entre los 30 a los 40°C, de 20 a 30°C en agua dulce y de 15 a 20°C en ambientes marinos (Das y Chandran, 2011).

Bajos niveles de fosfato y formas fijas de nitrógeno son a menudo los factores limitantes. Generalmente se emplea una relación C:N:P de 100:10:1. Sin embargo estudios de laboratorio indican que subpoblaciones de microorganismos requieren más de una relación adecuada N:P para una óptima degradación de los diferentes tipos de hidrocarburos que componen el petróleo crudo Smith y colaboradores (1998) evaluaron el efecto de la adición de 34 diferentes relaciones N:P en la degradación de dos hidrocarburos modelo (hexano y Phe) en suelos. Las mayores tasas de

biodegradación de hexano se obtuvieron con una relación N:P de 7:1. En contraposición, la biodegradación del Phe presenta una respuesta bimodal con dos relaciones N:P óptimas, una de 5:1 y otra de 20:1. Lo anterior es posible si existen poblaciones microbianas metabólicamente diferentes que puedan consumir el sustrato. Teóricamente, para convertir 1 g de hidrocarburo a material celular<sup>1</sup> se consumen aproximadamente 150 mg de N y 30 mg de P (Rosenberg y Ron, 1996).

Otros nutrientes como el potasio y el hierro también se consideran importantes en los procesos de biodegradación de hidrocarburos (Atlas y Hazen, 2011). En un estudio realizado por Reisfeld y colaboradores (1972) para determinar los factores que afectan la dispersión del crudo en agua de mar, encontraron que las mayores tasas de dispersión se lograron con concentraciones finales de fosfato de potasio y sulfato de amonio de 0.029 mM (10 mg/L) y 7.6 mM (2 g/L), respectivamente; lo que implica una relación N:P de 200:1. A pesar de que es necesario añadir nutrientes para mejorar la biodegradación de los hidrocarburos, una concentración excesiva de estos la puede inhibir. Algunos autores han reportado efectos negativos de niveles altos de N, P y K en la biodegradación de hidrocarburos en suelos y sedimentos (Chaillan *et al.*, 2006; Oudot *et al.*, 1998; Chaîneau *et al.*, 2005), en especial de los aromáticos (Carmichael y Pfaender, 1997). Mantener una cierta relación de nutrientes en las costas marinas es imposible debido al lavado de nutrientes debido a la acción de las olas y mareas.

El oxígeno no suele ser un factor limitante en ambientes marinos bien aireados (alta energía), pero sí en ambientes de baja energía como lagunas y marismas (Atlas, 1995; Atlas y Hazen, 2011), siendo la demanda teórica de oxígeno de 3.5 mg O<sub>2</sub>/mg HC (Brakstad, 2008). En humedales y pantanos la zona aerobia de los sedimentos es de unos milímetros de espesor, por lo que los sedimentos impactados con hidrocarburos usualmente conforman zonas anaerobias (Rosenberg y Ron, 1996).

La presencia de microorganismos con las capacidades metabólicas adecuadas es el principal factor biológico que limita la degradación de los hidrocarburos. En términos generales, los microorganismos degradadores de hidrocarburos en ambientes marinos prístinos conforman un 1% del total de la microflora, este valor se incrementa a un 10% en ambientes con derrames ocasionales de petróleo como el Golfo de México (Atlas y Hazen, 2011). La tasa de degradación en ambientes marinos prístinos es de 0.03 g/m<sup>3</sup>·d, mientras que en comunidades adaptadas oscila entre 0.5 a 50 g/m<sup>3</sup>·d (Atlas, 1995).

---

<sup>1</sup> Biomoléculas constituyentes de los seres vivos.

## **2.4 Biorremediación de aguas contaminadas con hidrocarburos**

La biorremediación puede llevarse a cabo ya sea por microorganismos autóctonos (bioestimulación) o mediante la introducción de cultivos con alto potencial de degradación (bioaumentación). Debido a que en las aguas marinas y en los sedimentos de los litorales existen poblaciones autóctonas microbianas degradadoras de hidrocarburos, la mayoría de las acciones de biorremediación se han centrado en desarrollar estrategias de bioestimulación adecuadas a las condiciones del sistema contaminado, que consisten primordialmente en la adición de nutrientes limitantes y en la aplicación de dispersantes (denominados también “agentes de superficie”), o en una combinación de estos procesos (Atlas, 1995; Brakstad, 2008).

### **2.4.1 Bioestimulación**

La adición de nutrientes ha demostrado superar los factores limitantes en ambientes marinos aerobios contaminados con hidrocarburos (Atlas, 1995); razón por la cual una gran parte de los estudios de bioestimulación se han centrado en la adición de fertilizantes y en el desarrollo y evaluación de formulaciones oleofílicas que mantienen los nutrientes en la interface aceite-agua, que es en donde se lleva a cabo la biodegradación (Swannell *et al.*, 1996). Ejemplo de ello es el trabajo realizado por Atlas y Budosh (1976), quienes llevaron a cabo experimentos de biodegradación de petróleo crudo Prudhoe Bay utilizando cilindros flotantes dentro de estanques salinos en Alaska. Después de 21 días de incubación, el sistema inoculado con bacterias degradadoras de hidrocarburos y suplementado con fertilizantes oleofílicos (fosfato ácido de octilo y urea parafinada) presentó la mayor remoción de hidrocarburos (65%), seguido del sistema suplementado sólo con fertilizantes (51%). El porcentaje de degradación de los tratamientos que únicamente contenían microorganismos fue del 27%; mientras el del control fue del 25%, reducción atribuida a los procesos de meteorización abiótica.

### **2.4.2 Bioaumentación**

Un gran número de empresas han desarrollado cultivos degradadores de hidrocarburos y la mayoría de los microorganismos considerados para un proceso de bioaumentación se obtienen por cultivo enriquecido de sitios previamente contaminados. Sin embargo, debido a que las bacterias y hongos degradadores de hidrocarburos se encuentran ampliamente distribuidos en hábitats marinos, dulceacuícolas y en suelos, la adición de microorganismos ha sido menos prometedora para tratar

derrames de petróleo que la adición de fertilizantes (Atlas, 1995). Los estudios de bioaumentación con organismos exógenos no han proporcionado información convincente de ser un enfoque eficaz para biorremediar contaminantes del petróleo en ambientes marinos. Para ser efectivo, los microorganismos exógenos deben competir exitosamente con los endógenos degradadores de hidrocarburos (Atlas, 1995). Goldstein y colaboradores (1985), afirman que la variabilidad de los resultados en los estudios de bioaumentación puede ser atribuido a que: (i) la concentración del contaminante puede ser muy baja para soportar el crecimiento de las especies inoculadas o bien la concentración del contaminante puede ser tóxica, (ii) los microorganismos adicionados pueden ser susceptibles a toxinas, (iii) la tasa de crecimiento de las especies inoculadas puede estar limitada por predadores presentes en el ambiente, (iv) las especies adicionadas podrían utilizar otros substratos en la naturaleza y, (v) los microorganismos sembrados pueden ser incapaces de moverse a través del entorno del contaminante.

En un esfuerzo por identificar los cultivos que podrían haber sido empleados en el derrame de petróleo del Exxon Valdez, se seleccionaron 10 productos de bioaumentación para la fase de laboratorio. Algunos de estos productos retrasaron la biodegradación, iniciándose después de un periodo de adaptación de 3 a 5 días, alcanzando niveles significativos sólo después de 20 a 30 días (Atlas, 1995). Aldrett y colaboradores (1997) evaluaron la biodegradación y toxicidad de 12 productos biológicos comerciales bioaumentados en agua marina con crudo meteorizado. Dando como resultado que solamente tres fueron efectivos cuando se compararon estadísticamente contra los controles adicionados con nutrientes, pero solo uno resultó en una toxicidad reducida cuando se empleaba según las concentraciones indicadas por el productor.

Según Brakstad (2008), la bioaumentación ha sido propuesta como un método para biorremediar suelos y sedimentos, a menudo como un complemento a la bioestimulación. La introducción de bacterias hidrocarbonoclasticas exógenas para destoxificar ambientes fríos contaminados con hidrocarburos ha tenido resultados variables. En un estudio realizado por Reinfeld y colaboradores (1972) para determinar los factores que afectan la dispersión del crudo en agua de mar por cultivos puros y mixtos, se determinó que la dispersión del crudo, tanto por la cepa aislada RAG-1 como por el cultivo mixto, fue dependiente de fuentes exógenas de N y P así como de la aireación. La mayor dispersión y reproducibilidad se obtuvo en cultivos con amonio, fosfato y RAG-1. Sin embargo, sin la adición de amonio ni fosfato no hubo dispersión del crudo, aún en los cultivos inoculados con RAG-1. En algunos experimentos, el agua de mar y el petróleo crudo proveyeron un inóculo suficiente de microorganismos, por lo que no fue necesaria la adición de cultivos exógenos.



Según Zhu y colaboradores (2004), para que la estrategia de bioaumentación tenga éxito los microorganismos introducidos deben ser capaces de: (i) degradar la mayoría de los componentes del petróleo, (ii) mantener su estabilidad genética y viabilidad durante periodos de almacenamiento, (iii) sobrevivir en ambientes extraños y hostiles, (iv) competir efectivamente con microorganismos indígenas y (v) moverse a través de los poros del sedimento a los contaminantes (Zhu *et al.*, 2004).

## 2.5 Microorganismos degradadores de hidrocarburos

Los microorganismos degradadores de hidrocarburos se encuentran ampliamente distribuidos en ecosistemas terrestres, marinos y dulceacuícolas (Okoh, 2006). En aguas que no han sido contaminadas con hidrocarburos, la población de microorganismos con las habilidades para degradar estos compuestos constituye menos del 1%; mientras que, en los sistemas altamente contaminados, como el Golfo de México, constituyen el 10% o más de la población total (U.S. Congress OTA, 1991).

Aunque ha sido posible aislar y caracterizar muchas bacterias capaces de degradar hidrocarburos del petróleo de ambientes marinos, la mayoría de las bacterias degradadoras de hidrocarburos podrían permanecer sin descubrir, debido a que una gran fracción de las bacterias que habitan los ambientes marinos son incultivables (Harayama *et al.*, 2004). Entre los géneros de bacterias degradadoras de petróleo que han sido aislados de ambientes marinos se encuentran: *Alcanivorax*, *Cycloclasticus*, *Neptunomonas*, *Oleiphilus*, *Oleispira* y *Planococcus*. Casi todos estos grupos de bacterias, exceptuando *Neptunomonas*, emplean fuentes limitadas de carbono y prefieren los hidrocarburos de petróleo, razón por lo que se les denomina bacterias hidrocarburoclásticas profesionales. La mayoría han sido reconocidas como degradadoras de alcanos y compuestos aromáticos como el tolueno, naftaleno (Naph) y Phe (Harayama *et al.*, 2004). Otras bacterias hidrocarburoclásticas no profesionales aisladas de ambientes marinos capaces de degradar Phe y criseno se encuentran dentro de los géneros: *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Marinomonas* y *Halomonas*.

Algunas bacterias aisladas de ambientes marinos han sido clasificadas dentro de géneros que incluyen bacterias terrestres como: *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Sphingomonas* y *Geobacillus* (Harayama *et al.*, 2004). Géneros como *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Flavobacterium* también tienen representantes de ambientes terrestres y marinos. Algunos géneros de bacterias

hidrocarbonoclasticas aisladas de sedimentos de manglar son: *Microbulbifer*, *Cellulomonas*, *Dietzia* y *Gordonia* (Brito *et al.*, 2006).

A mediados de la década de los 80, se tenía conocimiento de más de 70 géneros de microorganismos que incluyen bacterias, hongos filamentosos y levaduras (Tabla 3) capaces de degradar los componentes del petróleo (U.S. Congress OTA, 1991). A diferencia de las bacterias, los hongos no utilizan los hidrocarburos como fuente de carbono y de energía, pero transforman los HPAs cometabólicamente, es decir, necesitan de una fuente alternativa de carbono para iniciar el crecimiento de los organismos e inducir la producción de enzimas catabólicas (Juhasz y Naidu, 2000). Muchos de estos organismos tienen representantes tanto ambientes terrestres como acuáticos.

Tabla 3. Principales géneros de bacterias y hongos degradadores de hidrocarburos.

<b>Bacterias</b>	<b>Hongos y Levaduras</b>
<i>Achrornobacter</i>	<i>Allescheria</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>Aureobasidium</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Botrytis</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Candida</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Cephalosporium</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Cladosporium</i>
<i>Beneckea</i>	<i>Cunninghamella</i>
<i>Brevebacterium</i>	<i>Debaromyces</i>
<i>Coryneforms</i>	<i>Fusarium</i>
<i>Erwinia</i>	<i>Gonytrichum</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Hansenula</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Helminthosporium</i>
<i>Leumthrix</i>	<i>Mucor</i>
<i>Moraxella</i>	<i>Oidiodendrum</i>
<i>Nocardia</i>	<i>Paecylomyces</i>
<i>Peptococcus</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Sarcina</i>	<i>Phialophora</i>
<i>Spherotilus</i>	<i>Rhodospodium</i>
<i>Spirillum</i>	<i>Rhodotorula</i>
<i>Streptomyces</i>	<i>Saccharomyces</i>

<b>Bacterias</b>	<b>Hongos y Levaduras</b>
<i>Xanthomyces</i>	<i>Saccharomycopisis</i>
	<i>Scopulariopsis</i>
	<i>Sporobolomyces</i>
	<i>Torulopsis</i>
	<i>Trichoderma</i>
	<i>Trichosporon</i>

Fuente: Floodgate (1984) citado en U.S. Congress OTA, 1991.

Otros organismos degradadores de hidrocarburos son las cianobacterias y las algas eucariotas. Los trabajos realizados por Cerniglia y colaboradores (Cerniglia *et al.*, 1979; Cerniglia *et al.*, 1980a; Cerniglia *et al.*, 1980b) demuestran que tanto las cianobacterias como las algas son capaces de metabolizar los HPAs bajo condiciones fotoautotróficas. Durante los procesos de degradación del Naph y Phe, los metabolitos de degradación secundarios 1-naftol y trans-9,10-dihidroxi-9,10-dihidrofenantreno, indican que estos organismos metabolizan el Naph y Phe mediante la acción de enzimas monooxigenasas de manera más similar a lo reportado para hongos y mamíferos que a lo reportado para bacterias (Sección 2.3.1). Dentro de estos grupos de organismos destacan las cianobacterias marinas *Oscillatoria sp.* y *Agmenellum quadruplicatum*, algunas diatomeas y algas rojas y cafés. Debido a que estos organismos se encuentran ampliamente distribuidos en la zona fótica de los ambientes acuáticos, son importantes para la transformación de los HPAs durante un derrame de petróleo. Cerniglia (1993) presenta un listado de microorganismos degradadores de HPAs aislados de suelos contaminados con hidrocarburos (Tabla 4). En este listado se incluyen géneros de bacterias, cianobacterias, algas y hongos no mencionados en párrafos anteriores.

Chaillan y colaboradores (2004) identificaron 33 especies de microorganismos degradadores de hidrocarburos de suelos de Indonesia contaminados con petróleo. Algunos de los géneros de bacterias diferentes a los ya mencionados son: *Aeromicrobium*, *Burkholderia* y *Mycobacterium*. Entre los hongos destacan: *Amorphoteca*, *Neosartorya*, *Talaromyces* y *Graphium* y las levaduras: *Candida*, *Yarrowia* y *Pichia*.

Tabla 4. Principales géneros de microorganismos degradadores de hidrocarburos poliaromáticos (HPAs).

<b>Bacterias</b>	<b>Cianobacterias y algas</b>	<b>Hongos microscópicos</b>	<b>Hongos macroscópicos</b>
<i>Beijerinckia</i>	<i>Anabaena</i>	<i>Absidia</i>	<i>Bjerkandera</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Amphora</i>	<i>Basidiolobus</i>	<i>Chrysosporium</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Aphanocapsa</i>	<i>Choanephora</i>	<i>Panaeolus</i>
<i>Moraxella</i>	<i>Chlorella</i>	<i>Circinella</i>	<i>Phanaerochaete</i>
<i>Rhodococcus</i>	<i>Chlamydomonas</i>	<i>Claviceps</i>	<i>Psilocybe</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>Coccochloris</i>	<i>Cokeromyces</i>	<i>Ramaria</i>
	<i>Cylindrotheca</i>	<i>Conidiobolus</i>	<i>Smittium</i>
	<i>Dunaliella</i>	<i>Cunninghamella</i>	<i>Trametes</i>
	<i>Microcoleus</i>	<i>Emericellopsis</i>	
	<i>Navicula</i>	<i>Epicoccum</i>	
	<i>Nitzschia</i>	<i>Gilbertella</i>	
	<i>Nostoc</i>	<i>Gliocladium</i>	
	<i>Porphyridium</i>	<i>Helicostylum</i>	
	<i>Selenastrum</i>	<i>Hyphochytrium</i>	
	<i>Synedra</i>	<i>Linderina</i>	
	<i>Ulva</i>	<i>Mortierella</i>	
		<i>Neurospora</i>	
		<i>Pestalotia</i>	
		<i>Phycomyces</i>	
		<i>Phlyctochytrium</i>	
		<i>Rhizoctonia</i>	
		<i>Rhizophlyctis</i>	
		<i>Rhizopus</i>	
		<i>Saprolegnia</i>	
		<i>Sordaria</i>	
		<i>Syncephalastrum</i>	
		<i>Thamnidium</i>	
		<i>Zygorhynchus</i>	

Fuente: Adaptado de Cerniglia, 1993.

A raíz del derrame de petróleo del Deepwater Horizons surgieron nuevos estudios relacionados con los microorganismos capaces de degradar hidrocarburos. Justo después del inicio del derrame el orden *Oceanospirillales* se convirtió en el grupo predominante de microorganismos degradadores de hidrocarburos de la columna de agua (Hazen *et al.*, 2010; Mason *et al.*, 2012). *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter*, fueron los géneros predominantes en las playas de Pensacola Florida impactadas con hidrocarburos (Kostka *et al.*, 2011). Posteriormente se identificaron a los géneros *Alcanivorax* y *Marinobacter* como degradadores de hidrocarburos alifáticos y a los géneros *Alteromonas*, *Cycloclasticus* y *Colwellia* como degradadores de HPA (Gutierrez *et al.*, 2013). Otros géneros como *Halomonas* y *Pseudoalteromonas* mostraron capacidades enzimáticas para degradar hidrocarburos presentes tanto en la mancha superficial como en la pluma de agua, colectadas durante la fase activa del derrame (Gutierrez *et al.*, 2013).

Dentro del grupo de trabajo se ha empleado la tecnología del grano de café para remediar sitios contaminados con compuestos xenobióticos. Debido a su composición química, es posible el desarrollo de una gran variedad de microorganismos con potencial para degradar los hidrocarburos del petróleo y otros contaminantes. En el inóculo del grano verde de café se han identificado bacterias degradadoras de plaguicidas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Flavimonas oryzihabitans* y *Morganella morganii*. *P. aeruginosa* y *F. oryzihabitans* fueron elegidas por su mayor capacidad para degradar plaguicidas organoclorados como el 1,1,1-tricloro-2,2-bis (4-clorofenil) etano (DDT) y el endosulfán (Barragán-Huerta, 2006). También se han aislado bacterias productoras de biosurfactantes como *Bacillus cereus* (Velázquez-Aradillas *et al.*, 2010) y hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Absidia* con habilidad de degradar hidrocarburos (Zúñiga-Silva, 2009).

## **2.6 Importancia del grano de café en la degradación de hidrocarburos**

El empleo del grano de café en combinación con agentes texturizantes (que también se han empleado como soportes para el crecimiento de microorganismos en los procesos de biorremediación de suelo y agua), ha mostrado que es posible reducir altas concentraciones de hidrocarburos de fracción media (HFM), fracción pesada (HFP) y compuestos poliaromáticos (HPAs) (Roldán-Martín *et al.*, 2007; Zúñiga-Silva, 2009).

La tecnología desarrollada (Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2011) ha sido aplicada a escala comercial en suelo, subsuelo y mantos acuíferos someros contaminados con diesel y grasas, en varios contratos con PEMEX-Refinación (Rodríguez-Vázquez, 2008) y Ferrocarriles Nacionales de México en Liquidación (FNML) (Rodríguez-Vázquez, 2010; Rodríguez-Vázquez, 2011). A nivel laboratorio ha sido empleada en la biorremediación de aguas contaminadas con benceno y metil ter-butil éter (MTBE) (Ramírez-Castillo, 2009) y en agua salada contaminada con diesel (Bolaños-García, 2011), obteniéndose en todos los casos altos porcentajes de remoción de los contaminantes.

### **2.6.1 Microorganismos asociados al grano de café**

El grano de café es producido por los cafetos, que son arbustos del género *Coffea* que se localizan en regiones tropicales. Las especies que dominan el mercado internacional son: *Coffea arabica* (Arabica) y *Coffea canephora* (Robusta). Los cafetos producen frutos carnosos, llamados cerezas de café, que en estado de madurez presentan una coloración rojiza. Cada cereza posee dos núcleos y cada núcleo un grano de café.

Ferreira y colaboradores (2008) estudiaron la sucesión de comunidades microbianas durante la fermentación natural del café Arabica y encontraron una gran diversidad de microorganismos. Las bacterias fueron el grupo más numeroso al inicio de la fermentación cuando el contenido de humedad de los granos de café era alrededor del 68%. Las bacterias Gram-positivas representaron el 85.5% del total de bacterias y *Bacillus* fue el género dominante con alrededor de un 51% de total de este grupo. Entre las especies Gram-negativas destacan los géneros *Serratia*, *Enterobacter* y *Acinetobacter*. Alrededor el 22% de los microorganismos aislados corresponden a levaduras siendo los géneros más representativos: *Debaryomyces* (27%), *Pichia* (18.9%) y *Candida* (8%). Entre los hongos filamentosos destacan los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Cladosporium*. De los géneros y especies identificadas existen miembros que se sabe pueden degradar hidrocarburos del petróleo.

En términos generales, la diversidad y número de individuos por especie durante la sucesión ecológica microbiana estuvo influenciada principalmente por el contenido de humedad de las cerezas y del grano de café. La humedad del grano de café puede correlacionarse con la actividad del agua ( $a_w$ ) y es un factor que afecta el grado de colonización y las especies colonizadoras. Otros factores que influyen en la sucesión son la temperatura, la competencia por sustratos, la capacidad enzimática de las especies colonizadoras y la actividad antimicrobiana (Ferreira *et al.*, 2008).

Los azúcares más simples (glucosa, sacarosa y fructuosa) son utilizados por los microorganismos al inicio de la fermentación natural del café, disminuyendo la disponibilidad de estos azúcares para otros microorganismos, de manera que los polímeros complejos como la celulosa y pectina se convierten en la principal fuente de carbono, pero su uso depende del proceso de despolimerización (Ferreira *et al.*, 2008).

## 2.6.2 Características físico-químicas del grano de café

El café es uno de los productos más complejos desde el punto de vista de su composición química, la cual depende de la especie y variedad cultivada, ubicación del cultivo, condiciones climáticas, altitud, fertilidad del suelo, grado de maduración del grano, procesamiento y condiciones de almacenamiento (Bolívar, 2009). En términos generales 100 g de café seco contienen: 29% de pulpa seca, 12% cascarilla de pergamino, 4% mucílago (mesocarpio) y 55% de grano verde (Barragán-Huerta, 2006).

En el grano del café se pueden encontrar carbohidratos en forma de polisacáridos y de azúcares de bajo peso molecular, ácidos grasos, compuestos nitrogenados como aminoácidos, proteínas y alcaloides, compuestos fenólicos, minerales y ácidos alifáticos, entre otros (Tabla 5).

Tabla 5. Composición química porcentual en base seca del grano de café verde y tostado de las especies *Coffea arabica* y *Coffea canephora*.

Componente	<i>Coffea arabica</i>		<i>Coffea canephora</i>	
	Verde	Tostado	Verde	Tostado
Polisacáridos	50.0 – 55.0	24.0 – 39.0	37.0 – 47.0	-
Oligosacáridos	6.0 – 8.0	0 – 3.5	5.0 – 7.0	0 – 3.5
Lípidos	12.0 – 18.0	14.5 – 20.0	9.0 – 13.0	11.0 – 16.0
Proteínas	11.0 – 13.0	13.0 - 15.0	11.0 – 13.0	13.0 - 15.0
Aminoácidos	2.0	0	2.0	0
Cafeína	0.9 – 1.2	~1.0	1.6 – 2.4	~2.0
Trigonelina	1.0 – 1.2	0.5 – 1.0	0.6 – 0.75	0.3 – 0.6
Ácidos clorogénicos	5.5 – 8.0	1.2 – 2.3	7.0 – 10.0	3.9 – 4.6
Minerales	3.0 – 4.2	3.5 – 4.5	4.0 – 4.5	4.6 – 5.0
Ácidos alifáticos	1.5 – 2.0	1.0 – 1.5	1.5 – 2.0	1.0 – 1.5
Ácidos húmicos	-	16.0 – 17.0	-	16.0 – 17.0

Fuente: Clifford, 1985.

Los carbohidratos son los principales componentes de los granos de café, estos pueden estar presentes en forma de polisacáridos y como azúcares de bajo peso molecular. La fracción polisacárida constituye alrededor del 50% del peso seco del grano verde de café, mientras que los azúcares de bajo peso molecular el 5 y 7%. Durante el tostado se destruye la sacarosa y los polisacáridos se despolimerizan gradualmente hasta quedar pirolizados (Tabla 6).

Los componentes mayoritarios de la fracción polisacárida son los galactomananos (con una concentración próxima al 50% del total de polisacáridos), los arabinogalactanos (30%) y la celulosa (15%). Existen pequeñas cantidades de polisacáridos pécticos (4%) y xyloglucanos (Redgwell y Fischer, 2006). Según Bradbury y Halliday (1990), el contenido de carbohidratos poliméricos en el café Arabica es menor que en el café Robusta, el café Arabica posee un mayor contenido de carbohidratos de bajo peso molecular, el cual es principalmente sacarosa (Tabla 6).

Tabla 6. Composición porcentual de carbohidratos en base seca del grano verde de café de las especies *Coffea arabica* y *Coffea canephora*.

<b>Carbohidrato</b>	<b><i>Coffea arabica</i></b>	<b><i>Coffea canephora</i></b>
<b>Total Azúcares bajo peso molecular</b>	<b>6.2 – 9.5</b>	<b>3.2 – 7.5</b>
▪ Monosacáridos	0.2 – 0.5	0.2 – 0.5
▪ Sacarosa	6.0 – 9.0	3.0 – 7.0
<b>Total Polisacáridos</b>	<b>43.0 – 45.0</b>	<b>46.9 – 48.3</b>
▪ Manosa	21.3 – 22.5	21.7 – 22.4
▪ Galactosa	10.4 – 11.9	12.4 – 14.0
▪ Glucosa	6.7 – 7.8	7.8 – 8.7
▪ Arabinosa	3.4 – 4.0	3.8 – 4.1
▪ Ramnosa	0.3	0.3
▪ Xilosa	0 – 0.2	0.2

Fuente: Bradbury, 2001.

Con respecto a los azúcares de bajo peso molecular, en las primeras etapas de desarrollo del grano de café, la glucosa y la fructuosa son los azúcares mayoritarios, siendo el contenido de la primera aproximadamente el doble del de la fructuosa. Al finalizar el desarrollo del grano, las concentraciones de glucosa y fructuosa disminuyen, mientras que el contenido de sacarosa incrementa hasta valores porcentuales entre 5 a 9, lo que constituye el 100% del total de azúcares libres del grano maduro (Redgwell y Fishcer, 2006).



La fracción lipídica del endospermo se compone principalmente de triglicéridos, esteroides y tocoferoles, componentes encontrados en todos los aceites vegetales comestibles comunes (Speer y Kölling-Speer, 2006). El contenido de lípidos de *C. arabica* oscila entre 12 y 18% del peso seco del grano verde de café, mientras que el de *C. canephora* es ligeramente inferior (9 a 13%) (Tabla 5) (Speer y Kölling-Speer, 2006). Los lípidos se pueden encontrar esterificados con glicerol formando triglicéridos, ésteres de diterpenos, ésteres de esteroides y ácidos grasos libres (Speer y Kölling-Speer, 2006). Los lípidos saponificables predominantes son los triglicéridos, llegando a constituir entre el 70 y 80% del total de la fracción lipídica. El ácido linoleico y palmítico son los triglicéridos más importantes del grano verde de café, aunque también es posible encontrar ácido oleico, esteárico y arquídico (Tabla 7).

Tabla 7. Principales ácidos grasos presentes en el grano verde de café, expresado como porcentaje total de lípidos.

Componente	<i>Coffea sp.</i> <sup>a</sup>	<i>Coffea sp.</i> <sup>b</sup>	<i>C. arabica</i> <sup>c</sup>	<i>C. canephora</i> <sup>c</sup>
Linoleico C <sub>18:2</sub>	43.2 – 45.9	47.7	52.2 – 54.3	43.9 – 49.3
Palmítico C <sub>16:0</sub>	30.7 – 35.3	33.3	26.6 – 27.8	27.2 – 32.1
Oleico C <sub>18:1</sub>	7.6 – 10.1		6.7 – 8.2	9.7 – 14.2
Esteárico C <sub>18:0</sub>	6.6 – 9.0	7.3	5.6 – 6.3	5.8 – 7.2
Arquídico C <sub>20:0</sub>	2.7 – 3.3	2.5	2.6 – 2.8	2.7 – 4.3
Linolénico C <sub>18:3</sub>	1.1 – 1.7	1.7	2.2 – 2.6	0.9 – 1.4
Behénico C <sub>22:0</sub>	0.3 – 0.5	0.5	0.5 – 0.6	0.3 – 0.8
Mirístico C <sub>14:0</sub>	Trazas		Trazas	Trazas
Palmitoleico C <sub>16:1</sub>	Trazas		Trazas	Trazas
Margárico C <sub>17:0</sub>	Trazas		Trazas	Trazas

<sup>a</sup> Kroplien (1963, c.p. Debry, 1994, p. 82).

<sup>b</sup> Folstar *et al.*, 1977.

<sup>c</sup> Speer *et al.*, 1993.

Los compuestos nitrogenados comprenden las proteínas, los aminoácidos, la trigonelina y los alcaloides. La 1,3,7-trimetilxantina, conocida como cafeína, es el principal alcaloide del café. Un grano de café contiene en promedio de 1 a 2% de cafeína, a la que se le atribuye la actividad estimulante de la bebida de café. Los granos de café Robusta poseen una mayor concentración de cafeína (1.6 a 2.4) que los del café Arabica (0.9 a 1.2) (Tabla 5). Aunque sufre una ligera sublimación, la cafeína sobrevive al tueste (Clifford, 1975; Bolívar, 2009).

Otro alcaloide de gran importancia es la trigonelina, una metil betaína de la piridina, que desde el punto de vista bioquímico, es la matriz para la formación de la vitamina del complejo B. La trigonelina representa cerca del 1% del peso seco del café verde pero no sobrevive al tueste. Se encuentra en mayor concentración en el café Arabica (0.9 a 1.2) que en Robusta (0.6 a 0.75) (Tabla 5) (Clifford, 1975).

En el grano verde de café las proteínas pueden encontrarse en el citoplasma o unidas a polisacáridos en las paredes celulares. Aproximadamente un tercio la proteína total, está asociado con el arabinogalactano de la pared celular (Clifford, 1985). En términos generales el contenido proteínico en ambas especies de café oscila entre el 11 al 13% (Tabla 5). La fracción soluble en agua, constituye aproximadamente la mitad del contenido total de proteína.

Los aminoácidos libres conforman un 2% tanto en *C. arabica* como en *C. canephora*. En el café están presentes en los tejidos de las plantas. Entre los aminoácidos libres destacan el ácido glutámico, ácido aspártico, asparagina y alalina.

Los minerales juegan un papel importante en el crecimiento estructural de la planta y la semilla. Forman parte de la composición química de proteínas y lípidos. Las cenizas del café están compuestas aproximadamente en un 40% por óxidos de potasio (Clifford, 1975). Otros macroelementos presentes son: magnesio, calcio y sodio (Tabla 8). El contenido de minerales es más alto en *C. canephora* que en *C. arabica*.

Tabla 8. Composición mineral en base seca del grano verde de café de *Coffea arabica*.

<b>Componentes mayoritarios (mg)</b>		<b>Componentes minoritarios (µg)</b>	
<b>K</b>	1,350.0 – 1,712.0	<b>Cr</b>	74.0 – 1,327.0
<b>Mg</b>	142.0 – 176.0	<b>V</b>	70.0 – 110.0
<b>Ca</b>	76.0 – 20.0	<b>Ba</b>	100.0 – 615.0
<b>Na</b>	2.3 – 17.0	<b>Ni</b>	11.0 – 388.0
<b>Fe</b>	2.1 – 10.5	<b>Co</b>	10.0 – 93.0
<b>Mn</b>	1.1 – 9.8	<b>Pb</b>	18.0 – 77.0
<b>Rb</b>	0.6 – 4.2	<b>Mo</b>	11.0 – 27.0
<b>Zn</b>	0.5 – 3.2	<b>Ti</b>	4.0 – 20.0
<b>Cu</b>	0.5 – 3.2	<b>Cd</b>	3.0
<b>Sr</b>	0.4 – 1.3		

Fuente: Clifford, 1975.

## 2.7 Inmovilización

La pérdida de la biomasa activa y la susceptibilidad que tienen los microorganismos a diferentes factores abióticos y al contaminante que se desea degradar, destacan entre los principales problemas asociados al empleo de microorganismos en los procesos de biorremediación. Para minimizar el impacto de estos factores y coadyuvar a su establecimiento y supervivencia, se ha impulsado el uso de diferentes técnicas, entre las que sobresale la inmovilización de la biomasa activa. En términos generales las células inmovilizadas presentan mayor actividad catalítica que las libres y los microorganismos inmovilizados suelen tolerar concentraciones más altas de compuestos tóxicos (O'Reilly y Crawford, 1989; Cunningham *et al.*, 2004; Ha *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010).

El incremento en la actividad metabólica obedece a diferentes aspectos. En los ecosistemas acuáticos la biomasa libre puede ser arrastrada, impidiendo que se mantenga o aumente su concentración (Garzón y Barragán, 2008), mientras que la biomasa inmovilizada aumenta más fácilmente. Tanto el soporte como la biopelícula que algunos de estos microorganismos forman, atrapan los nutrientes y sustancias presentes en el medio y al estar más disponibles para las células inmovilizadas, la actividad metabólica se ve favorecida (Madigan *et al.*, 2004). Por otra parte, Galazzo y Bailey (1990) observaron que cuando los microorganismos son inmovilizados en perlas de alginato de calcio, hay una disminución del pH al interior de éstas. La disminución del pH se debe a que la membrana citoplasmática incrementa la permeabilidad a protones, ocasionando un mayor consumo de ATP, lo que se refleja en el aumento del metabolismo.

Marrie y Costerton (1981) encontraron que aquellos microorganismos que son capaces de formar aglomerados o biopelículas en condiciones naturales, presentan mayor resistencia a los antisépticos. Este fenómeno se puede atribuir tanto a las diferencias fisiológicas entre los microorganismos que forman aglomerados y los de crecimiento libre y a la mayor concentración de nutrientes alrededor de la biopelícula o soporte. Asimismo, los exopolisacáridos secretados por los microorganismos reducen la difusión de sustancias tóxicas hacia el interior de la biopelícula (Lazarova y Manem, 1995).

Se han descrito en la literatura casos de inmovilización de células activas para la degradación de los hidrocarburos del petróleo, sus derivados y subproductos. Por ejemplo, Wiesel y colaboradores (1993) inmovilizaron un cultivo mixto en arcilla granular para la degradación de HPAs; mientras que Wilson y Bradley (1997) inmovilizaron células de *Pseudomonas fluorescens* en un soporte inerte (Drizit) para degradar diesel esloveno en cuerpos de agua salada.

Cunningham y colaboradores (2004) utilizaron la técnica de atrapamiento en matriz para co-inmovilizar en un adsorbente sintético organismos nativos de suelos contaminados con hidrocarburos. *Aspergillus sp.* fue inmovilizado en alginato de calcio para degradar fenol proveniente de las refinerías del petróleo (dos Passos *et al.*, 2010). Sarma y Pakshirajan (2011) inmovilizaron a la bacteria *Mycobacterium frederiksbergense* en perlas de alginato para degradar pireno. Posteriormente, estos mismos investigadores encapsularon el contaminante dentro de perlas de quitosano recubiertas de alginato y alcohol polivinílico para dosificar la entrega del contaminante a los microorganismos (Sarma y Pakshirajan, 2011). Largo (2010), inmovilizó células de *Alcanivorax venustensis* en hidrogeles de quitosano y goma de xantana para degradar alcanos en ambientes marinos.

### **2.7.1 Métodos de inmovilización**

La inmovilización es el término que describe las diferentes formas de unión o atrapamiento de los microorganismos a un material o superficie (Cassidy *et al.*, 1996), la cual puede ser natural o inducida. Entre las diversas formas se incluye la adsorción a superficies, unión covalente a soportes, floculación natural, entrecruzamiento de células, atrapamiento en matrices y encapsulación.

#### ***Adsorción a superficie y unión covalente***

La adsorción a superficies o materiales de soporte es un tipo de inmovilización pasiva en la cual algunos microorganismos tienden a unirse a superficies y crecer en ellas (Garzón y Barragán, 2008). Es un proceso reversible y puede derivar en la pérdida de los microorganismos durante el proceso de operación (Zhou *et al.*, 2008). La adherencia se da a través de estructuras celulares (la cápsula o fimbrias en el caso de las bacterias y las hifas en los hongos) o sustancias que los microorganismos segregan (Garzón y Barragán, 2008). Estas sustancias extracelulares son complejas estructuras con sistemas de canales de agua y aireación, los cuales permiten el transporte de nutrientes, desechos, oxígeno y agua, entre otros. Gracias a estos canales se generan gradientes de tensión de pH y oxígeno, lo que permite que se desarrollen micronichos y diversos grupos de microorganismos (Figura 5a) (Kourkoutas *et al.*, 2004).

La unión covalente a superficies es un tipo de inmovilización activa o artificial en la cual los microorganismos son inmovilizados mediante reacciones de unión con grupos reactivos ( $\text{NH}_2$  y  $\text{COOH}$ ) en la superficie de la célula y no existen barreras físicas entre las células y el disolvente.

Después de la inmovilización incrementa la estabilidad de los microorganismos de manera significativa, pero su bioactividad tiende a disminuir durante el proceso de post-operación (Figura 5b) (Zhou *et al.*, 2008).

Entre los materiales empleados en estos dos tipos de inmovilización destacan las matrices orgánicas, ya que brindan mayor adsorción que las sintéticas. Los materiales orgánicos tienen mayor cantidad de grupos radicales amino y carboxil, así como una mayor cantidad de nutrientes, por lo que no es necesario agregar fuentes adicionales de carbono o nitrógeno. Algunos ejemplos de matrices orgánicas son: fibra de estropajo (fruto de la *Luffa*), fibras de coco, fibra de agave tequilero (*Agave tequilana*), granos de café y fibra de madera de papaya. Entre los materiales sintéticos destacan: vidrio, cerámicas porosas, fibras de polipropileno, perlas de vidrio, perlas de sílice, cubos de poliuretano, espuma de poliuretano, espuma de polivinil y carbón activado granular. Algunos de estos materiales es necesario tratarlos con policones, quitosano, hierro u otros compuestos químicos con el fin de facilitar la colonización del soporte (Cohen, 2001).

### **Floculación**

La floculación natural consiste en la agregación o aglomeración natural de las células formando grupos y sedimentos (flóculos) en el medio en el que se encuentran (Figura 5c). Se usa principalmente para inmovilizar mohos, hongos y células vegetales (Kourkoutas *et al.*, 2004). En la floculación artificial, denominada también entrecruzamiento de células, se emplean agentes floculantes para unir células entre sí que por naturaleza propia no tienden a aglomerarse (Figura 5d). Para ello se emplean reactivos con grupos funcionales (glutaraldehído, bisdiazobenzidina, diisocianato de hexametileno, quitosano). El método es muy simple pero es difícil controlar apropiadamente el proceso. Los principales factores que influyen en la agregación son: la composición de la pared celular, pH, oxígeno disuelto y la composición del medio de cultivo (Kourkoutas *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2008).

### **Atrapamiento**

El atrapamiento en matriz es un atrapamiento artificial o inducido que consiste en la inmovilización de células dentro de una matriz porosa, la cual impide la difusión de las células en el medio, pero permite el paso de metabolitos y nutrientes (Figura 5e) (Kourkoutas *et al.*, 2004). En la encapsulación los organismos son encerrados en un polímero de tipo gel ya sea orgánico o

inorgánico. Las matrices poliméricas empleadas tienen una estructura porosa, de manera que los contaminantes y los productos metabólicos pueden difundirse a través de esta. No obstante lo anterior, la difusión es uno de los grandes retos a superar (Figura 5d) (Kourkoutas *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2008).

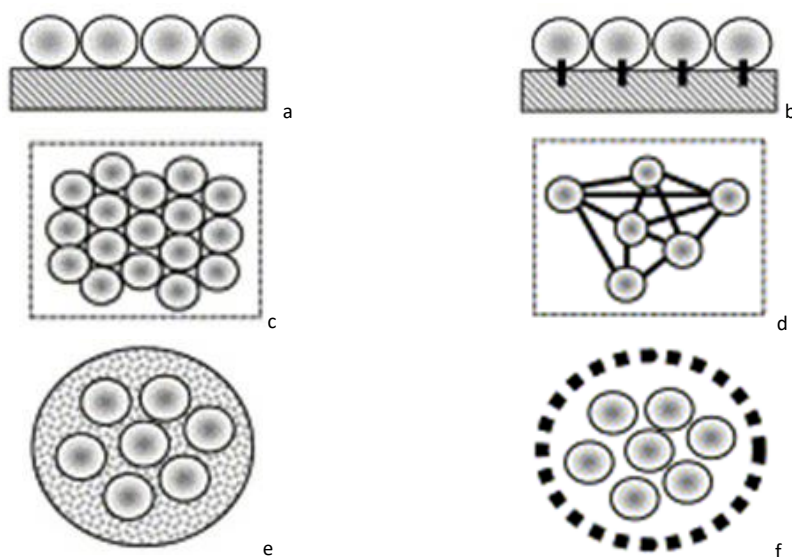


Figura 5. Métodos de inmovilización más comunes.

a. Adsorción a superficie, b. Unión covalente a superficie, c. Floculación natural o agregación, d. Floculación artificial o entrecruzamiento, e. Atrapamiento dentro de una matriz porosa, f. Microencapsulación.

Fuente: Kourkoutas *et al.*, 2004.

Entre los materiales empleados destacan los polímeros orgánicos naturales (agar, agarosa, alginato, carragenina, quitosano, goma xantana) y los sintéticos (poliacrilamida, alcohol polivinílico, polietilenglicol). Los primeros tienen como ventajas el hecho de que no son tóxicos, no contaminan, son biodegradables y permiten mayor viabilidad celular. No obstante lo anterior, el carácter biodegradable, les confiere menor estabilidad a largo plazo, además de que el tamaño de poro es más grande, lo que incide en una mayor pérdida de células y proteínas de interés. En contraposición, con los polímeros sintéticos se obtiene mayor estabilidad a largo plazo y menor tamaño de poro, lo que permite una liberación gradual de los microorganismos al ambiente (Cassidy *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 2008). La elección de los soportes depende del tipo de organismo a inmovilizar, de las características del lugar a remediar y de la aplicación a la que se va a destinar.

Con la finalidad de subsanar las limitantes que presentan tanto los polímeros naturales como los sintéticos y aprovechar las ventajas que cada uno ofrece, se han creado formulaciones con mezclas de estos polímeros. Tal es el caso de Song y colaboradores (2005) quienes desarrollaron un método

híbrido de inmovilización basado en las técnicas de atrapamiento en matriz y encapsulación para la desnitrificación biológica en reactores por lote y lecho empacado. Utilizaron alcohol polivinílico (APV) para atrapar las células y goma Xantana en el proceso de encapsulación. Las matrices de APV proporcionaron la elasticidad y la fuerza mecánica adecuada para un alto estrés de cizalla; mientras que con el proceso de encapsulación se incrementó la capacidad de carga, se disminuyó la fuga de células y se incrementó la actividad metabólica.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

---

Durante los procesos de biorremediación de los ecosistemas acuáticos se producen procesos de extrema dilución de la biomasa activa y de los nutrientes. Para subsanar dicha limitante se propone inmovilizar a los microorganismos asociados al grano de café para remediar aguas contaminadas con hidrocarburos. La inmovilización del cultivo mixto puede mejorar su actividad metabólica, así como las tasas de degradación de los hidrocarburos, al protegerlos de depredadores, de cambios bruscos en las condiciones fisicoquímicas del ambiente y de la toxicidad de los compuestos que se desea degradar.



## **4. HIPÓTESIS**

---

### **4.1 General**

La inmovilización de los microorganismos del grano de café mejorará las tasas de degradación del fenantreno en ambientes acuáticos.

### **4.2 Específicas**

1. El conocer las condiciones de cultivo más adecuadas para los microorganismos asociados al grano de café, favorecerá la degradación del fenantreno.
2. El inmovilizar a los microorganismos asociados al grano de café proporcionará a las células un microambiente más estable, lo que favorecerá la degradación del fenantreno.

## **5. OBJETIVOS**

---

### **5.1 General**

Determinar el potencial de los microorganismos asociados al grano de café para degradar fenantreno en ambientes acuáticos.

### **5.2 Específicos**

1. Identificar taxonómicamente a los microorganismos degradadores de hidrocarburos asociados al grano de café.
2. Determinar las condiciones de cultivo más adecuadas para la degradación de fenantreno por los microorganismos asociados al grano de café en ambientes acuáticos.
3. Evaluar el efecto de inmovilizar a los microorganismos asociados al grano de café en la degradación de fenantreno.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

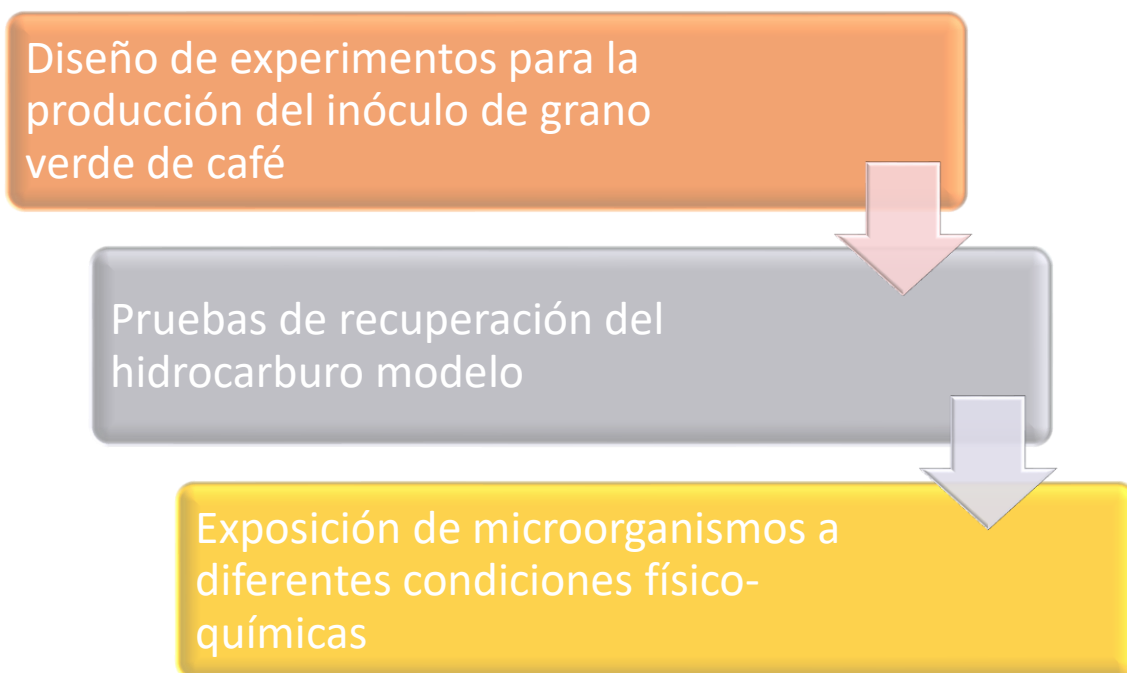
---

La estrategia experimental se dividió en cuatro etapas.

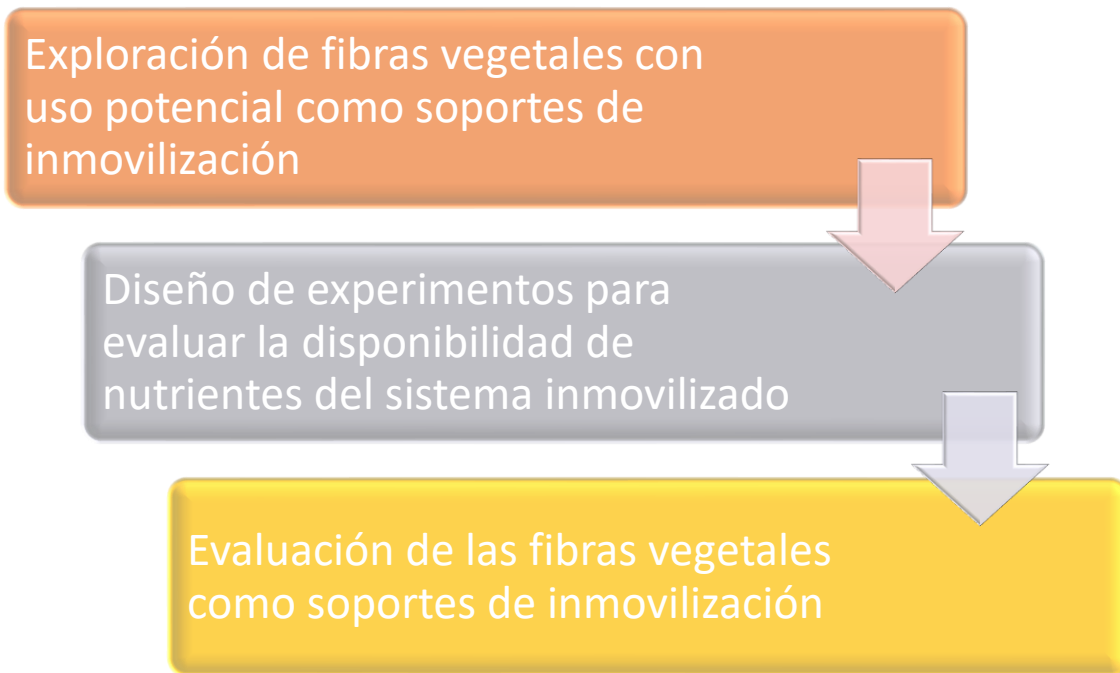
### Primera etapa: Identificación taxonómica



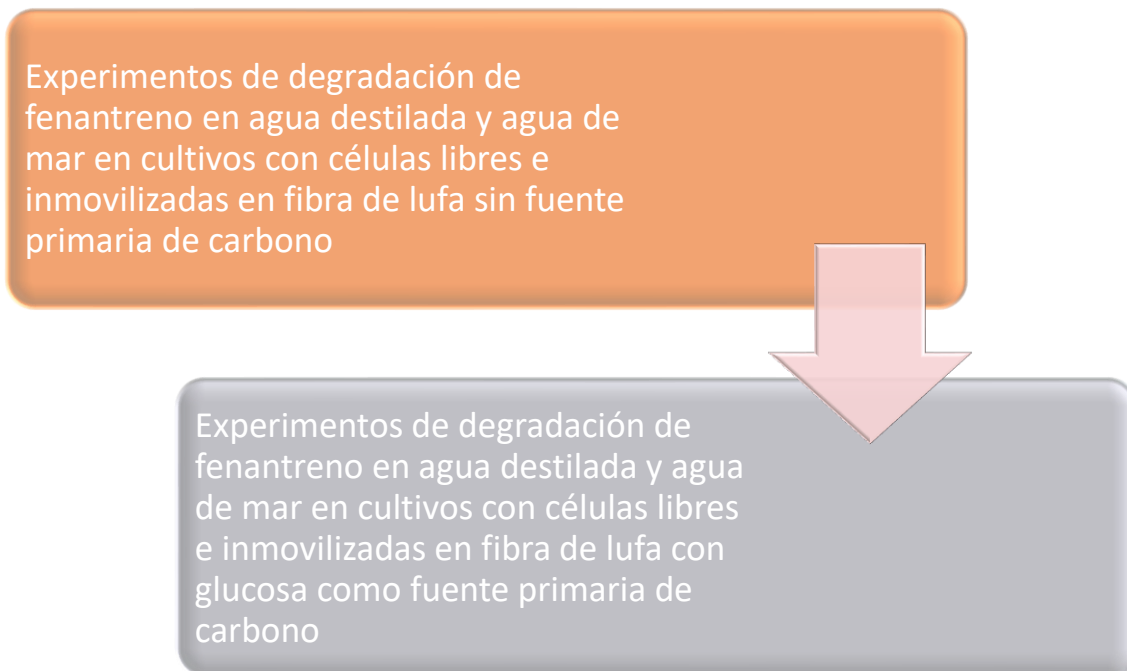
### Segunda etapa: Principales factores que favorecen la degradación de hidrocarburos



### Tercera etapa: Desarrollo del sistema de inmovilización



### Cuarta etapa: Experimentos de degradación de fenantreno



## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 7.1 Medios de cultivo

#### 7.1.1 Medio de cultivo empleado en el enriquecimiento secuencial

El diesel se esteriliza por filtración a través de un filtro de membrana de nylon de 0.22  $\mu\text{m}$  y fibra de vidrio antes de su incorporación al medio de cultivo. A 880 mL de agua destilada se adiciona la glucosa, la peptona, el diesel estéril, el cloruro de amonio y las sales de fosfato. Las soluciones de macroelementos y microelementos se preparan por separado, teniendo cuidado de que las sales no precipiten. Las tres soluciones se esterilizan por 20 min a 121°C y se dejan enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se adiciona al medio de cultivo 100 mL de la solución de macroelementos y 10 mL de la solución de microelementos y se mezcla por inversión.

<b>Compuesto</b>	<b>g/L</b>
Glucosa	1.00
Diesel	10 mL
Peptona	1.00
NH <sub>4</sub> Cl	1.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.313
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.188
Solución de macroelementos 10X	100 mL
Solución de microelementos 100X	10 mL

Nota: La glucosa se adicionó únicamente en el primer ciclo de enriquecimiento para el crecimiento inicial del inóculo.

#### **Solución de macroelementos (10X)**

A 1000 mL de agua destilada se adicionan los siguientes compuestos. La solución se esteriliza por 20 min a 121°C y se deja enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se añaden 100 mL de esta solución al medio de cultivo y se mezcla por inversión. La solución se conserva en frascos de vidrio de color ámbar en refrigeración entre 2 a 4°C.

Compuesto	g/L	10X (g/L)
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.500	5.00
NaHCO <sub>3</sub>	0.150	1.50
CaCl <sub>2</sub>	0.075	0.75
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.036	0.36
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.031	0.31

### Solución de microelementos (100X)

A 1000 mL de agua destilada se adicionan los siguientes compuestos. La solución se esteriliza por 20 min a 121°C y se deja enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se añaden 10 mL de esta solución al medio de cultivo y se mezcla por inversión. La solución se conserva en frascos de vidrio de color ámbar en refrigeración entre 2 a 4°C.

Compuesto	g/L	100X (g/L)
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.020	2.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.020	2.0
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.025	2.5
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.010	1.0
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.001	0.1

### 7.1.2 Medio de cultivo con balance C:N

Se prepara una solución madre de fenantreno en hexano de 500 mg/L. A 890 mL de agua destilada o de agua de mar, se adiciona la glucosa, el extracto de malta, la polipeptona y las fuentes de nitrógeno y fósforo. Una vez disueltos los componentes, se esteriliza por 20 min a 121°C y se deja enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionan 100 mL de la solución de macroelementos y 10 mL de la solución de microelementos.

El fenantreno se adiciona a las unidades experimentales 48 h antes de su inoculación, éstas se tapan con tela para cirugía y se dejan en la campana de extracción hasta la completa evaporación del hexano. Posteriormente se añade el medio de cultivo, la solución de macroelementos y microelementos, el grano verde de café (GVC) y la fibra de lufa estéril según corresponda, en la proporción requerida.

### Sin fibra de lufa

Fuente	Masa (g/L)	C (g/L)	N (g/L)	P (g/L)
Fenantreno	0.200	0.189		
GVC	21.750	6.197	0.442	
Glucosa	1.000	0.400		
Ext. De Malta	1.000	0.290	0.007	
Polipeptona	1.000	0.450	0.115	
NaNO <sub>3</sub>	1.000		0.165	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.875			0.199

GVC: grano verde de café

### Con fibra de lufa

Fuente	Masa (g/L)	C (g/L)	N (g/L)	P (g/L)
Fenantreno	0.200	0.189		
GVC	21.750	6.197	0.442	
Fibra de lufa	6.750	0.982	0.039	
Glucosa	1.000	0.400		
Ext. De Malta	1.000	0.290	0.007	
Polipeptona	1.000	0.450	0.115	
NaNO <sub>3</sub>	1.000		0.165	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.875			0.199

GVC: grano verde de café

### 7.1.3 Rosa de bengala (RB)

Este medio es conveniente para aislar los hongos porque reduce la extensión de las colonias sin afectar la germinación de las esporas (pH=7.2). Se preparan por separado las soluciones de cloranfenicol y de rosa de bengala y se esterilizan. A 998.5 mL de agua se adiciona la glucosa, la peptona, el sulfato de magnesio, el fosfato de potasio y el agar. Una vez disueltos todos los componentes, se añade el cloranfenicol y el rosa de bengala. El medio de cultivo se esteriliza por 20 min a 121°C. Cuando la temperatura desciende entre 40 y 45°C se vierte en cajas Petri.

Compuesto	g/L
Glucosa	10.0
Peptona	5.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0
Agar	15.0

Compuesto	g/L
Cloranfenicol (10% w/v en agua)	1.0 mL
Rosa de Bengala (5% w/v en agua)	0.5 mL

Observaciones: El cloranfenicol es termoestable, pero puede ser reemplazado por otros antibióticos que se agregan asépticamente al medio estéril fundido, tal como la clortetraciclina (10 mL de solución acuosa al 1% w/v en 1 L de medio).

#### 7.1.4 Verde de malaquita (VM)

Medio para el aislamiento selectivo de *Fusarium sp.* sin el uso de bifenil policlorado (PCNB). Este medio también es más inhibitorio para especies de *Aspergillus* y *Penicillium*. Se preparan por separado las soluciones de estreptomycin y cloranfenicol en una concentración conocida y se esterilizan. En otro matraz se adiciona el agar, la peptona, el  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , el  $\text{MgSO}_4$  y el verde de malaquita y se esteriliza por 20 min a  $121^\circ\text{C}$  y se deja enfriar hasta que alcance una temperatura entre  $45$  a  $50^\circ\text{C}$ . Posteriormente bajo condiciones asépticas se añade la solución estéril de estreptomycin y de cloranfenicol. Cuando la temperatura desciende entre  $40$  y  $45^\circ\text{C}$  se vierte en cajas Petri.

Compuesto	g/L
Agar	20.0
Peptona	15.0
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
Oxalato de Verde Malaquita	2.5 mg
Estreptomycin	50 mg/L
Cloranfenicol	100 mg/L

Nota: Como no se contaba con estreptomycin se agregó 33.33% adicional de cloranfenicol.



### 7.1.5 Levadura-Malta-Sacarosa (LMS)

Es un medio para aislamiento y recuento de mohos y levaduras (pH=6.8). Algunos autores sugieren que funciona mejor que el Rosa de Bengala-Diclorán. Se preparan por separado las soluciones de cloranfenicol y de clortetraciclina y se esterilizan. A 980 mL de agua destilada se adiciona el resto de los compuestos, se esteriliza por 20 min a 121°C, se enfría entre 45 a 50°C y se agrega 10 mL de la solución estéril de cloranfenicol y 10 mL de la solución estéril de clortetraciclina.

<b>Compuesto</b>	<b>g/L</b>
Sacarosa	30.0
Ext. de Malta	15.0
Ext. de Levadura	5.0
Triptona	2.0
Bilis desecada (oxgall)	2.0
Nitrato de Sodio	0.5
Agar	20.0
Cloranfenicol 0.5%	10 mL
Clortetraciclina 0.5%	10 mL

Nota: Como no se contaba con clortetraciclina se agregó 33.33% adicional de cloranfenicol.

### 7.1.6 Agar para cuenta en placa (PCA)

Es un medio para evaluar el total de bacterias viables en una muestra. No es un medio selectivo (pH=7.0). Se pesan los ingredientes, se disuelven en 1 L de agua destilada y se esteriliza por 20 min a 121°C.

<b>Compuesto</b>	<b>g/L</b>
Peptona	5.0
Ext. de Levadura	2.5
Glucosa	1.0
Agar	15.0

### 7.1.7 Agar nutritivo (AN)

Medio de cultivo usado normalmente como rutina para bacteria y otros microorganismos poco exigentes en lo que se refiere a requerimientos nutritivos (pH=6.8). Se pesan los ingredientes, se disuelven en 1 L de agua destilada y se esteriliza por 20 min a 121°C.

Compuesto	g/L
Extracto de Res	3.0
Peptona	5.0
Agar	15.0

### 7.1.8 Medio Wunder

Medio de cultivo desarrollado por Wunder y colaboradores (1994) para evaluar el metabolismo de *Aspergillus niger* para degradar HPAs y es empleado normalmente en el Laboratorio de Compuestos Xenobióticos en los experimentos de degradación con hongos filamentosos. Se pesan los ingredientes, se disuelven en 1 L de agua destilada y se esteriliza por 20 min a 121°C.

Compuesto	g/L
Glucosa	10.000
Polipeptona	1.000
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.000
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.500
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.875
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.125
CaCl <sub>2</sub>	0.075
NaCl	0.100
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0.020
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.001

Fuente: Wunder *et al.*, 1994

### 7.1.9 Bushnell-Haas (BH)

Este medio de cultivo se recomienda para evaluar el potencial de los microorganismos para degradar hidrocarburos (Bushnell y Haas, 1941). Contiene todos los nutrientes excepto fuente de carbono y los hidrocarburos a evaluar. Para probar un hidrocarburo líquido, éste se coloca sobre la superficie del agar inoculado. Para probar la hidrocarburo volátil, las cajas Petri que contienen el

medio de cultivo se invierten y el hidrocarburo se vierte en la tapa. Se pesan los ingredientes, se disuelven en 1 L de agua destilada y se esteriliza por 20 min a 121°C.

<b>Compuesto</b>	<b>g/L</b>
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.20
CaCl <sub>2</sub>	0.02
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.00
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.00
FeCl <sub>3</sub>	0.05
Agar	20.00

Fuente: Bushnell y Haas, 1941

## **7.2 Métodos analíticos**

### **7.2.1 Cálculo de la capacidad de retención de agua del grano de café**

La capacidad de retención del agua (CRA) se cuantificó según lo descrito por San Juan y colaboradores (2006).

### **7.2.2 Monitoreo de la actividad microbiana para la producción del inóculo**

Se pesó 1 g de grano de café molido y se colocó en botellas serológicas de 125 mL. Se agregó agua con base en el valor porcentual de la CRA requerida. Las unidades experimentales (UE) se taparon con tapones de plástico, se registró el peso de cada UE y se dejaron incubar por siete días. La producción de CO<sub>2</sub> se cuantificó inyectando 2 mL de muestra del espacio de cabeza de las UE a un cromatógrafo de gases Gow-Mac, modelo 550, equipado con un detector de conductividad térmica. Las condiciones de operación fueron las siguientes: helio como gas acarreador a un flujo de 55 mL/min; temperatura de la columna a 25 °C, temperatura del inyector a 30 °C y temperatura del detector a 100 °C. Después de tomadas las lecturas, se agregó a cada UE el agua perdida debido a los procesos de evapotranspiración. El sistema se aireó durante 10 min para evitar la acumulación de CO<sub>2</sub> y permitir el intercambio de gases (Arriaga y Revah, 2005).

### **7.2.3 Determinación de cenizas**

El método empleado corresponde al descrito por Franco y colaboradores (1990). La determinación de cenizas se cuantificó mediante la incineración de la muestra hasta la obtención de un residuo inorgánico que corresponde a la fracción de cenizas.

### **7.2.4 Cuantificación de la actividad del agua**

La actividad del agua se determinó bajo condiciones isotérmicas mediante un Thermoconstanter Novasina HUMIDAT-TH1 equipado con sensor de temperatura y humedad. El principio es el siguiente: la actividad del agua se determina a partir de la humedad relativa del aire que rodea la muestra cuando el aire y la muestra están en equilibrio. La muestra se coloca en un espacio cerrado donde este equilibrio puede tener lugar. Una vez que esto ocurre, la actividad de agua de la muestra y la humedad relativa del aire se igualan.

### **7.2.5 Diseño de experimentos Plackett-Burman**

Se realizó un diseño Plackett-Burman con 7 variables (seis nutricionales y un tensoactivo) con el propósito de exponer a los microorganismos asociados al grano de café a diferentes factores químicos y determinar su efecto en la degradación de Phe en agua destilada.

El diseño experimental Plackett-Burman es una variante de los diseños factoriales fraccionados de dos niveles (nivel alto y bajo) (Montgomery, 2007) que permite una rápida evaluación de los efectos de varios componentes del medio de cultivo y proporciona indicaciones de cómo cada componente puede afectar la degradación del contaminante. En la [Tabla 9](#) se presentan la matriz del diseño con los valores codificados de las variables.

Tabla 9. Matriz del diseño Plackett-Burman con los valores codificados de las variables.

Trat.	Factores						
	1	2	3	4	5	6	7
T1	+	+	+	-	+	-	-
T2	-	+	+	+	-	+	-
T3	-	-	+	+	+	-	+
T4	+	-	-	+	+	+	-
T5	-	+	-	-	+	+	+
T6	+	-	+	-	-	+	+
T7	+	+	-	+	-	-	+
T8	-	-	-	-	-	-	-

A cada unidad experimental se añadió el equivalente al 1% de la biomasa en peso seco de grano de café (0.42 a 0.86 mm de tamaño de partícula) previamente colonizado, 40 mL de medio de cultivo y 180 mg/L de Phe. Se tomó como base la concentración de carbono presente en 200 mg/L de Phe y se utilizaron las relaciones C:N:P de 100:20:2 y 100:5:1. Se empleó nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ ) y peptona como fuente inorgánica y orgánica de nitrógeno, respectivamente y, fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) como fuente inorgánica de fósforo. Los otros nutrientes adicionados fueron: magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) y hierro ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Para hacer disponible el Phe a los microorganismos se empleó el tensoactivo no iónico Tween 80 al 0.5 y 1.5% (v/v). Para el cálculo del error experimental se definieron 4 puntos centrales (PC).

Los cultivos se incubaron durante 4 y 9 días a 28°C y 120 rpm. Para conocer la remoción abiótica debido a los procesos de foto-oxidación del Phe, se establecieron tres cultivos con agua destilada y 180 mg/L de Phe.

### 7.2.6 Cuantificación de azúcares totales con reactivo de antrona

El contenido de carbohidratos es cuantificado por hidrólisis de los polisacáridos en azúcares más simples empleando ácido sulfúrico (Dreywood, 1946; Brooks *et al.*, 1986). La concentración de azúcares se calculó directamente a partir de una curva de calibración con concentraciones entre 25 a 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  empleando una solución patrón de 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La absorbencia se leyó en un espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer, Lambda 3A.

### **7.2.7 Determinación de amonio por el método de azul de indofenol**

Se determinó de acuerdo a Garay-Tinoco y colaboradores (2003). El contenido de amonio se calculó directamente a partir de una curva de calibración. En la presente investigación se emplearon dos curvas, la primera con valores comprendidos entre 0.075 y 0.6 mg-N/L y la segunda entre 0.6 y 1.0 mg-N/L. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer, Lambda 3A.

### **7.2.8 Determinación de nitrato por el método de sulfato de brucina**

Se determinó según lo establecido por la norma mexicana: NMX-AA-079-SCFI-2001. El contenido de nitrato se calculó directamente a partir de una curva de calibración con valores comprendidos entre 0.2 y 1.0  $\mu\text{g}\cdot\text{N}$ . La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer, Lambda 3A.

### **7.2.9 Determinación de fósforo reactivo por el método del ácido ascórbico**

Se determinó de acuerdo al método reportado por Garay-Tinoco y colaboradores (2003).

La concentración de iones fosfato se calculó a partir de una curva de calibración de 1 a 10  $\mu\text{mol/L}$ . La absorbancia se midió en un espectrofotómetro UV-1800 Shimadzu.

### **7.2.10 Cuantificación de fenantreno**

#### ***7.2.10.1 Extracción de fenantreno residual en medio líquido***

La extracción de Phe se realizó en medio líquido libre de células, por lo que las muestras se filtraron al vacío en un matraz Kitasato con embudo de porcelana y papel filtro de poro medio. Para la extracción líquido-líquido se utilizaron embudos de separación (US EPA Method 3510-C).

#### ***7.2.10.2 Extracción de fenantreno residual adsorbido a biomasa y al grano de café***

Después de filtrar las muestras al vacío, la biomasa y las partículas de grano de café se colocaron en tubos de ensayo de 7.5 a 10 mL con tapa de rosca. El Phe residual de estas matrices se extrajo mediante sonicación (Guerin, 1998).

### **7.2.10.3 Cuantificación de fenantreno**

La cuantificación de Phe se llevó a cabo empleando un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detector UV. Como fase móvil se empleó una solución 75:25 de acetonitrilo:agua con un flujo de 1 mL/min y como fase estacionaria una columna Vydac de intercambio iónico C18. En el detector se estableció en 254 nm como la longitud de onda para la detección de HPAs. Se inyectaron 20 µL de muestra. Los análisis se realizaron por triplicado. La concentración de Phe presente en las muestras se calculó a partir de una curva de calibración del contaminante (US EPA Method 8310).

### **7.2.11 Fijación de las fibras de lufa para su observación por microscopía electrónica de barrido**

Después del proceso de inmovilización, las fibras de lufa se colocaron en una solución de paraformaldehído al 2% por 24 h en refrigeración. Se retiró la solución fijadora y se realizaron lavados de 10 min cada uno con regulador de fosfato 0.1 M (pH=7.2) y con agua destilada. Las muestras se deshidrataron con lavados de soluciones de acetona de concentración creciente (50, 70, 90 y 100% v/v) y se mantuvieron en desecador por 24 h (Alves *et al.*, 2013). Posteriormente, las muestras se recubrieron con 20 nm de oro y se observaron en un microscopio electrónico de barrido AURIGA 3916 – FESEM.

### **7.2.12 Espectroscopía en el infrarrojo cercano de la fibra de lufa**

Las fibras de lufa se molieron con un molino de mano y se tamizaron con un tamiz número 180 con una abertura de malla de 0.091 mm. Los análisis de reflectancia se realizaron en un FTIR Varian modelo 640 cubriendo un rango espectral de 700 a 400 nm en intervalos de 2 nm.

### **7.2.13 Cuantificación de proteína total extracelular**

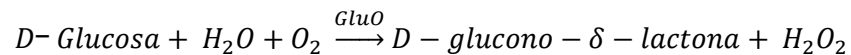
Se realizó por el método de Bradford (1976). La curva se realizó tanto en agua destilada como en agua de mar proveniente de Santa Cruz, Oaxaca. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer, Lambda 3A. El blanco se preparó con 1000 µL de agua (destilada o de mar) en lugar de muestra, mientras que la curva patrón se elaboró con los siguientes estándares: 5, 10, 20 y 40 µg/mL de albúmina.

### 7.2.14 Glucosa oxidasa (GO)

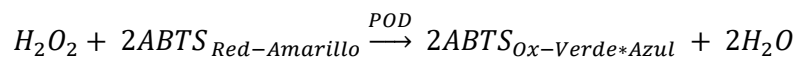
La glucosa oxidasa (GO) de los ascomicetos es una flavoproteína homodimérica extracelular que contiene como cofactor al flavín adenín dinucleótido (FAD) unido muy fuertemente a cada monómero. La enzima cataliza la reacción en donde la glucosa es oxidada a D-glucono- $\delta$ -lactona y peróxido de hidrógeno usando el oxígeno molecular como aceptor de electrones (Bankar *et al.*, 2009) (Ecuación 2).

El método empleado es una adaptación del ensayo bioquímico para la cuantificación de la GO de Sigma-Aldrich, pero en lugar de utilizar la *o*-Dianisidina como sustrato cromogénico se emplea 2,2'-Azino-di-[etilbenzotiazolina-sulfonato] (ABTS), el cual forma un producto oxidado verde-azul que es medido espectrofotométricamente a 420 nm.

La glucosa es oxidada a D-glucono- $\delta$ -lactona y peróxido de hidrógeno por la GO (Ecuación 2). El peróxido de hidrógeno es posteriormente utilizado para oxidar a un sustrato cromogénico (ABTS) en una segunda reacción con la Peroxidasa de rábano (POD) lo que resulta en un cambio de color (Ecuación 3). La intensidad del color, medida a 420 nm, es proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno.



Ecuación 2. Reacción catalizada por la enzima glucosa oxidasa.



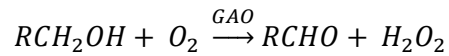
Ecuación 3. Reacción del sistema acoplado Peroxidasa /ABTS para la cuantificación de la enzima glucosa oxidasa.

La concentración de la GO en las muestras se calculó a partir de una curva de calibración con valores comprendidos entre 0.001 y 0.04 U/mL de GO. Una unidad de la enzima se define como la cantidad de enzima requerida para producir 1  $\mu$ mol de peróxido de hidrógeno por minuto bajo las condiciones estándares del ensayo. La curva se realizó tanto en agua destilada como en agua de mar proveniente de Santa Cruz, Oaxaca. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer, Lambda 3A.



### 7.2.15 Galactosa oxidasa (GAO)

La galactosa oxidasa (GAO) es una enzima que ha sido aislada de cultivos fúngicos de diversas especies pertenecientes al género *Fusarium* (Amara *et al.*, 1963; Tressel y Kosman, 1982; Lino *et al.*, 2006; Alberton *et al.*, 2007). Es un monómero compuesto de tres dominios con un átomo de Cu(II) cercano a la superficie del segundo dominio (Baron *et al.*, 1994). La enzima cataliza la oxidación estereoespecífica de D-isómeros de un amplio rango de sustratos entre los que se incluyen la D-galactosa, polisacáridos con D-galactosa y alcoholes primarios, conduciendo a la producción del aldehído correspondiente y de peróxido de hidrógeno (Ecuación 4).



Ecuación 4. Reacción catalizada por la enzima galactosa oxidasa.

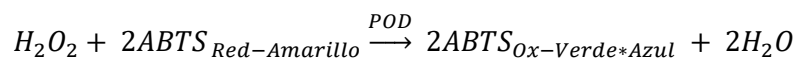
Presenta además una amplia especificidad para los oxidantes, dentro de los cuales destacan agentes redox de un electrón como:  $Mn^{3+}$ , EDTA y  $K_3Fe(CN)_6$ , los cuales pueden actuar como aceptores de electrones en ausencia de oxígeno molecular. Estudios demuestran que además de catalizar la oxidación de alcoholes, la enzima adicionalmente convierte los aldehídos a los carboxilatos correspondientes (Whittaker y Whittaker, 1988).

#### Fundamento:

El método más usual para cuantificar la actividad de la Galactosa Oxidasa (GAO) es medir la velocidad de reacción en un sistema acoplado Peroxidasa/ABTS en donde la D-galactosa es oxidada a D-galacto-hexodialdosa y peróxido de hidrógeno (Ecuación 5). El peróxido de hidrógeno es posteriormente utilizado para oxidar a un sustrato cromogénico en una segunda reacción acoplada con la Peroxidasa de rábano (POD) (Ecuación 6). Se mide el incremento en la absorbancia a 420 nm resultado de la oxidación del sustrato cromogénico (ABTS).



Ecuación 5. Reacción catalizada por la enzima galactosa oxidasa sobre la D-galactosa.



Ecuación 6. Reacción del sistema acoplado Peroxidasa /ABTS para la cuantificación de la enzima galactosa oxidasa.

La concentración de la GAO en las muestras se calculó a partir de una curva de calibración con valores comprendidos entre 0.00 y 0.06 U/mL de GAO. Una unidad de la enzima se define como la cantidad de enzima requerida para producir 1  $\mu\text{mol}$  de peróxido de hidrógeno por minuto bajo las condiciones estándares del ensayo. La curva se realizó tanto en agua destilada como en agua de mar, pero en esta última la actividad enzimática se inhibió completamente. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer, Lambda 3A.

## 7.3 Técnicas microbiológicas

### 7.3.1 Enriquecimiento secuencial

El protocolo empleado para aislar a los microorganismos asociados al grano de café con potencial para degradar hidrocarburos se dividió en cuatro etapas: colonización del grano de café, enriquecimiento secuencial, aislamiento de colonias y cuenta microbiana.

#### ***I Etapa: Colonización del grano de café***

Se pesaron 4 g de café molido y se colocaron en una charola. Se adicionó el volumen de agua necesario para la Capacidad de Retención de Agua (CRA) deseada y se registró el peso de cada charola. En este trabajo se empleó una capacidad de campo del 20% tanto para el grano de café verde como para el café tostado percolado. Posteriormente, las charolas se colocaron dentro de una bolsa de plástico abierta. Cada día durante un periodo de cinco días, se pesaron las charolas con los granos de café y se adicionó el agua perdida debido a los procesos de evapotranspiración.

#### ***II Etapa: Enriquecimiento Secuencial***

Se inocularon 40 mL de medio de cultivo con 1 g de café molido previamente colonizado en matraces Erlenmeyer de 125 mL de capacidad. El inóculo inicial se creció en medio líquido Wunder modificado (Wunder *et al.* 1994) con 0.1% (w/v) de glucosa (1 g/L) y diesel al 1.0% (v/v). Los cultivos se incubaron por 5 días a 28 °C y 120 rpm.

Posteriormente se transfirió una alícuota de 4 mL a 36 mL de medio de cultivo fresco (FD 1:10) y se incubó bajo las mismas condiciones. A partir de este momento a los medios de cultivo empleados para realizar los ciclos de enriquecimiento no se les adicionó glucosa. Se realizaron seis ciclos más de enriquecimiento para un total de siete ([Figura 6](#)).

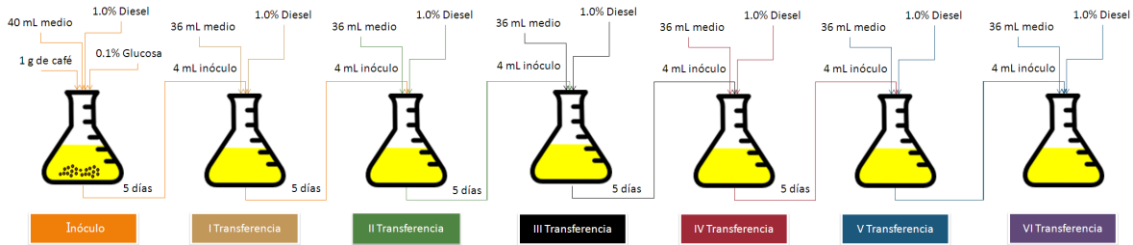


Figura 6. Sistema de enriquecimiento secuencial para el aislamiento de microorganismos degradadores de hidrocarburos a partir de granos de café previamente colonizado.

### III Etapa: Aislamiento de colonias

1. Al concluir el séptimo ciclo de enriquecimiento se realizaron diluciones seriadas. Se tomó 1 mL del cultivo resultante y se adicionó 9 mL de solución salina estéril al 0.90% hasta obtener diluciones  $1 \times 10^{-6}$ .
2. Para el aislamiento de colonias de levaduras y hongos, se tomaron alícuotas de 1 mL de las primeras tres diluciones y se inocularon en cajas Petri con los medios respectivos (Levadura-Malta-Sacarosa (LMS) para levaduras; Rosa de Bengala (RB) y Verde de Malaquita (VM) para hongos). Las cajas se incubaron a 28 °C de tres a siete días.
3. En el caso de las bacterias, se tomaron alícuotas de 1 mL de las últimas tres diluciones y se inocularon en cajas Petri conteniendo Agar Nutritivo (AN) y Plate-Count-Agar (PCA). Las cajas se incubaron de 24 a 48 h a 37 °C (Figura 7).

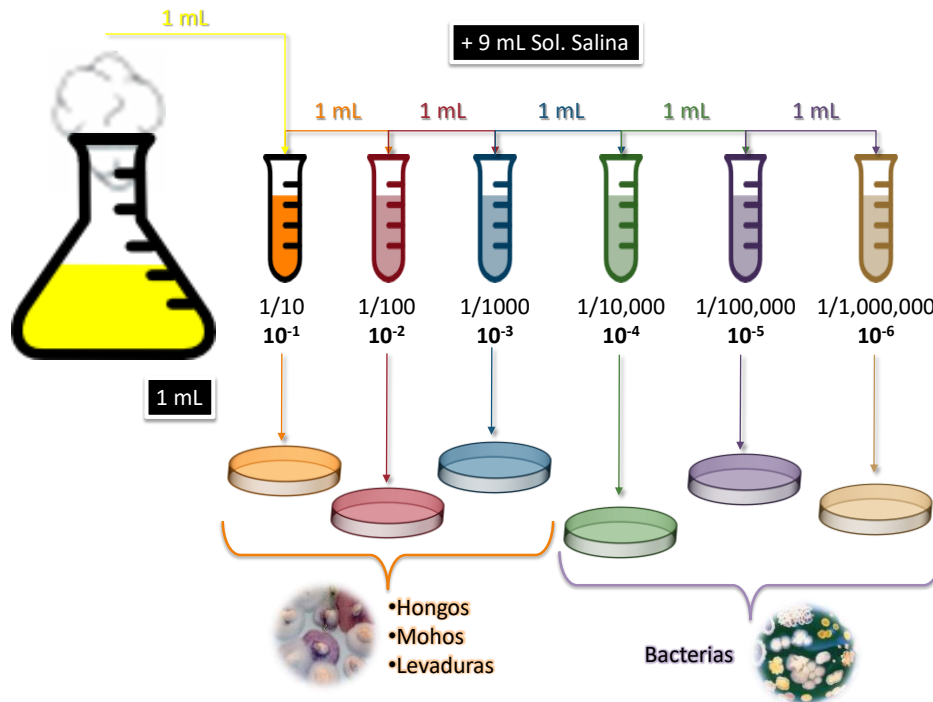


Figura 7. Diluciones seriadas para el aislamiento y recuento de microorganismos degradadores de hidrocarburos a partir de un inóculo obtenido a partir de ciclos de enriquecimiento secuencial.

#### IV Etapa: Cuenta microbiana

La cuenta de microorganismos se realizó a partir de las diluciones seriadas por cuenta en placa de las unidades formadoras de colonias (UFC), las cuales se calcularon con base en la Ecuación 7.

$$\frac{UFC}{mL} = Colonias\ Contadas \times Factor\ Dilución \times Volúmen\ Inóculo$$

Ecuación 7. Ecuación para calcular las unidades formadoras de colonias.

#### 7.3.2 Identificación de género y posible especie de los hongos filamentosos

Para identificar a los hongos filamentosos se observó dentro de la morfología macroscópica ciertas características como: topografía, textura y color de la cepa. Posteriormente se realizaron microcultivos para observar la morfología microscópica entre los que destacan los siguientes elementos: hifas, estructuras de sostén, conidios, conidióforos y fiálides.

Para la identificación del género y posible especie fue necesario utilizar claves taxonómicas, teniendo en cuenta las características macro y microscópicas de cada cepa. Las características observadas fueron confrontadas con las descripciones reportadas por Barnett y Barry (1998) sobre

identificación de hongos filamentosos. Para la observación al microscopio el microcultivo se cubrió con un cubreobjeto al que se le adicionó previamente una gota de azul de lactofenol.

### **7.3.3 Condiciones de cultivo para las pruebas de actividad enzimática**

Para la producción del inóculo (colonización del café) se emplearon las condiciones de cultivo del I8 (al GVC con un tamaño de partícula entre 0.42 a 0.86 mm se adicionó el agua necesaria para una CRA del GVC del 40%; Sección 8.2.1.1). A matraces Erlenmeyer de 125 mL de capacidad con 40 mL de agua (destilada o de mar, según tratamiento) y 180 mg/L de Phe, se adicionó el equivalente a 1 g de biomasa en base seca de GVC colonizado. Los cultivos se incubaron a 28°C y 120 rpm durante tres días. Como controles se emplearon tratamientos con GVC sin colonizar en agua sin esterilizar y tratamientos con GVC estéril en agua estéril. Estos últimos se utilizaron como blancos para contrarrestar posibles interferencias por color.

### **7.3.4 Crecimiento en placa en medio sólido Bushnell-Hass**

*Pseudomonas putida*, *Klebsiella variicola*, *Candida orthopsilosis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Aspergillus niger* se sembraron en placa con medio de cultivo Bushnell-Hass (Bushnell y Haas, 1941) suplementado con 1% (v/v) de diesel estéril (esterilizado por filtración con filtro de membrana de nylon de 0.22 µm y fibra de vidrio) como única fuente de carbono (BH-D). Como controles, se emplearon cajas Petri con medio de cultivo Bushnell-Hass con glucosa (BH-G) al 1% (w/v).

### **7.3.5 Cinéticas de crecimiento de cultivos axénicos y co-cultivos en cultivo líquido con hidrocarburos como única fuente de carbono**

#### ***I Parte***

Las cepas se crecieron en cajas Petri con medio de cultivo Bushnell-Haas adicionado con 100 µL de diesel como fuente de carbono. La levadura *C. orthopsilosis* se incubó por 5 días, mientras que los hongos por 8 días, ambos a 28°C.

Los preinóculos se crecieron como cultivos axénicos en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 40 mL de medio Wunder modificado sin glucosa (Wunder *et al.*, 1994) y diesel estéril al 1% (v/v) como única fuente de carbono. En el caso de *C. orthopsilosis* se adicionó 1 mL de células suspendidas en solución salina (0.85% w/v) con una densidad óptica de una unidad a 600 nm; mientras que los

preinóculos de los hongos filamentosos *F. oxysporum* y *F. solani* se adicionó 1 disco de agar de 7.9 mm de diámetro. Los cultivos se incubaron durante tres días a 28°C y 120 rpm.

Las cinéticas de crecimiento se realizaron en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 40 mL de medio de cultivo y 50 mg/L de Phe como única fuente de carbono. Los cultivos axénicos se inocularon con un 5% (v/v) del respectivo preinóculo, mientras que los co-cultivos con un 2.5% (v/v) de cada preinóculo. Los cultivos se incubaron durante seis días a 28°C y 120 rpm. La cuantificación de biomasa se realizó por peso seco a 60°C por 48 h.

## ***II Parte***

Las condiciones de cultivo fueron las mismas que las descritas en la primera parte, la diferencia radica en que se utilizó 50 mg/L de Phe en lugar de diesel como fuente de carbono para realizar las cinéticas de crecimiento. Además los cultivos inoculados con *F. solani* se incubaron por 216 h, mientras que los inoculados con *C. orthopsilosis* por 72 h, ambos a 28±2°C. La cuantificación de la biomasa se realizó por peso seco a 60°C por 48 h.

### **7.3.6 Cinéticas de degradación de fenantreno en cultivo líquido con células libres**

Para evaluar la degradación de Phe con células libres se emplearon los siguientes cultivos: el cultivo mixto del GVC, cultivos axénicos de *C. orthopsilosis* y de *F. solani* y el co-cultivo compuesto por *C. orthopsilosis* y *F. solani*.

La preparación del cultivo mixto del GVC se efectuó siguiendo las condiciones de cultivo para las pruebas de actividad enzimática (Sección 7.3.3), mientras que para los cultivos axénicos y el co-cultivo se siguieron las condiciones de cultivo de la Sección 7.3.5. La concentración de Phe fue de 50 mg/L. Los cultivos se incubaron durante seis días a 28°C y 120 rpm. En todos los casos se trabajó con al menos dos tipos de controles:

- C1: utilizado para evaluar las pérdidas del contaminante debido a procesos físico-químicos con medio de cultivo y 50 mg/L de Phe.
- C2: utilizado para evaluar la remoción abiótica con medio de cultivo, 50 mg/L de Phe y biomasa estéril.

### 7.3.7 Proceso de inmovilización en fibras de *Luffa cylindrica*

Se emplearon dos variedades de fibras de estropajo (*Luffa cylindrica* Roem) disponibles en el mercado para inmovilizar a los microorganismos del GVC (Figura 8). La fibra vegetal *L. cylindrica 1* es pequeña, posee tres cavidades placentarias y el espesor promedio de las paredes es de  $4.80 \pm 0.18$  mm. La fibra *L. cylindrica 2* es más larga y compacta, con menor tamaño de poro, posee 4 cavidades placentarias y el espesor promedio de las paredes es de  $7.36 \pm 0.51$  mm.



Figura 8. Corte transversal de dos variedades del fruto de la fibra de estropajo *Luffa cylindrica*. A la izquierda *Luffa cylindrica 1*, a la derecha *Luffa cylindrica 2*.

En términos generales el proceso de inmovilización es el siguiente: después de adicionar medio de cultivo a las UE e inocularlas se adiciona la fibra de lufa previamente lavada, secada y llevada a peso constante. Los cultivos se incuban a  $28^{\circ}\text{C}$  y 125 rpm.

### 7.3.8 Cinéticas de degradación de fenantreno en cultivo líquido con células inmovilizadas en fibras de lufa

Al igual que en las cinéticas de degradación con células libres se empleó el cultivo mixto del GVC, cultivos axénicos y el co-cultivo compuesto por *C. orthopsilosis* y *F. solani*. Las condiciones de cultivo para la obtención del inóculo del cultivo mixto del GVC y de los cultivos axénicos y el co-cultivo fueron las mismas que las descritas en la sección 7.3.6.

El proceso de inmovilización fue el siguiente: a matraces Erlenmeyer de 500 mL de capacidad nominal se adicionaron 120 mL de medio de cultivo, 1% (v/v) de diesel estéril como única fuente de carbono y  $0.5167 \pm 0.0051$  g de fibra de estropajo. Los cultivos se incubaron durante tres días a  $28^{\circ}\text{C}$  y 120 rpm. Los experimentos de degradación se realizaron en matraces Erlenmeyer de 125 mL de

capacidad con 40 mL de medio de cultivo y 50 mg/L de Phe y  $0.1722 \pm 0.0033$  g de fibra de estropajo con los microorganismos inmovilizados. Los cultivos se incubaron durante seis días a 28°C y 120 rpm.

### **7.3.9 Tolerancia a la salinidad de los microorganismos asociados al grano verde de café**

Para evaluar la capacidad de los microorganismos del GVC en agua de mar, éstos se crecieron tanto en agua destilada como de mar, esta última proveniente de Salina Cruz, Oaxaca [pH 7.4, conductividad eléctrica > 20 mS/cm y salinidad =  $35.31 \pm 0.1$  PSU]. Los microorganismos se cultivaron en medio Wunder modificado con únicamente 1 g/L de glucosa (Wunder *et al.* 1994). El inóculo se preparó siguiendo las condiciones de cultivo de la Sección 7.3.3. Los cultivos se incubaron por tres días a 28°C y 125 rpm. La biomasa se cuantificó como incremento en peso seco.

## **7.4 Análisis estadístico**

Se empleó la prueba estadística Least Significant Difference (LSD) para comparar las medias entre tratamientos debido a que es la prueba más estricta para realizar comparaciones múltiples de datos. El análisis estadístico se realizó en SAS v 9.0; mientras que el análisis de varianza de los modelos Superficie-Respuesta en Design Expert v 6.0.6. Origin Pro v8.1 se utilizó para ajustar las curvas de crecimiento a los modelos matemáticos.



## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### 8.1 Primera etapa: Identificación taxonómica

Esta etapa consistió en aislar a los microorganismos asociados al grano de café tolerantes a diesel mediante etapas sucesivas de enriquecimiento secuencial en cultivo líquido. Se utilizaron dos tipos de café: grano verde de café (GCV) y café tostado percolado<sup>2</sup> (CTP). El GVC posee un tamaño de partícula de 0.86 a 2.0 mm y es una mezcla de café proveniente de los estados de Veracruz y de Oaxaca, mientras que el CTP provino del estado de Veracruz.

Después del enriquecimiento secuencial se procedió al conteo de células viables y al aislamiento de las colonias mediante la técnica de dilución en placa. Para ello se utilizaron los siguientes medios y selectivos: Levadura-Malta-Sacarosa (LMS) para levaduras y mohos; Rosa de Bengala (RB) y Verde de Malaquita (VM) para hongos y, Agar Nutritivo (AN) y Agar para Cuenta en Placa (PCA) para las bacterias.

#### 8.1.1 Cuenta microbiana

Los resultados del conteo de células viables se presentan en el [Gráfico 2](#). El tratamiento con mayor cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) en medios selectivos para levaduras, mohos y hongos corresponde al CTP; mientras que el tratamiento con mayor cantidad de UFC en medios selectivos para bacterias corresponde al CV. Como lo que se busca es un balance entre las poblaciones de hongos, levaduras, mohos y bacterias, se decide utilizar el GVC en posteriores experimentos ya que la diferencia entre el grupo de las bacterias y el de los hongos es menor.

---

<sup>2</sup> Café tostado molido gastado; es decir, aquel que ha sido empleado para preparar una bebida de café.

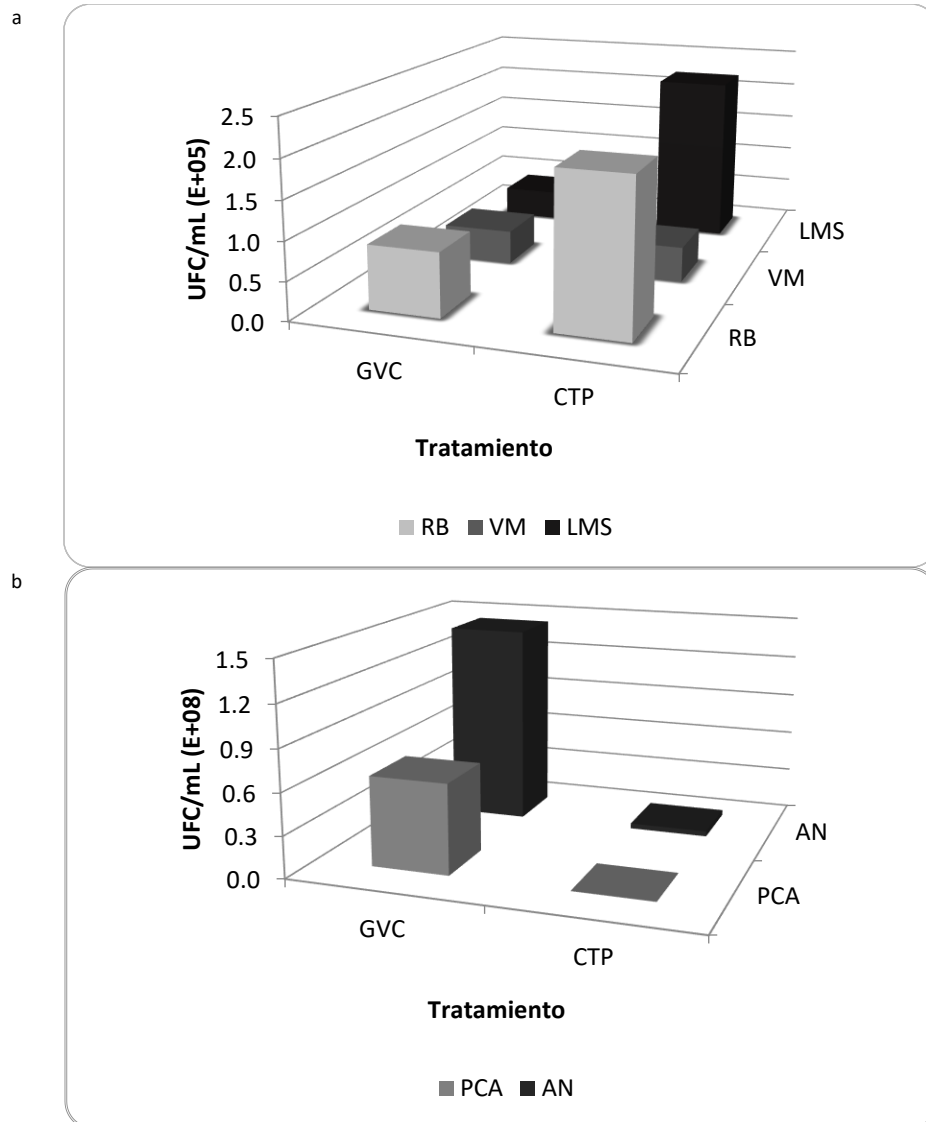


Gráfico 2. Conteo de células viables según tratamiento en diferentes medios de cultivo. GVC = Café Verde, CTP = Café Tostado Percolado. 3a. Medios de cultivo selectivos para levaduras, mohos y hongos: RB = Rosa de Bengala, VM = Verde de Malaquita, LMS = Levadura-Malta-Sacarosa. 3b. Medios de cultivo para evaluar bacterias: PCA = Agar para Cuenta en Placa, AN = Agar Nutritivo.

Se aislaron 7 microorganismos; 3 hongos filamentosos, 2 levaduras y 2 bacterias. Con ayuda de las claves taxonómicas (Barnett y Barry, 1998) se logró identificar a uno de los hongos a nivel de especie como *Aspergillus niger*, mientras que los dos restantes fueron identificados como pertenecientes al género *Fusarium*. Estos últimos se enviaron a identificar a nivel de especie al *Fungal Biodiversity Centre* localizado en Holanda y fueron identificados como *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum*, empleando técnicas moleculares (fragmento 18s-ITS1-5.8s-ITS2-28s rRNA)

Las levaduras y las bacterias fueron identificadas por la Colección Mexicana de Cultivos Microbianos mediante morfología de la colonia y pruebas bioquímicas (API 20C AUX y API20 (NE y E), respectivamente) y moleculares (fragmentos 16s-ITS1-5.8s-26s y 16s rRNA, respectivamente). Las especies de levaduras corresponden a *Candida orthopsilosis* (Tavanti *et al.*, 2005) y *Rhodotorula mucilaginosa*, mientras que las bacterias a *Pseudomonas putida* y *Klebsiella variicola*. Para distinguir esta última especie de *Klebsiella pneumoniae*, se realizó adicionalmente la prueba de asimilación de adonitol (Rosenblueth *et al.*, 2004). Todos los géneros reportados en este trabajo (*Fusarium*, *Aspergillus*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Pseudomonas* y *Klebsiella*) han sido encontrados asociadas a plántulas y a las cerezas del café ya sea durante la maduración, fermentación o almacenamiento de los granos (van Pee y Castelein, 1972; Silva *et al.*, 2000; Beux *et al.*, 2003; Posada y Vega, 2006; Silva *et al.*, 2008; Vilela *et al.*, 2010).

## **Hongos Filamentosos**

### ***Aspergillus niger***

Pertenece a la división *Deuteromycota*, clase *Hyphomycetes*, orden *Hyphomycetales* y familia *Moniliaceae* (Barnett y Barry, 1998).

#### **Características macroscópicas**

Colonias en medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA) de crecimiento rápido, el anverso de las colonias presentó inicialmente una coloración blanca a ligeramente amarillenta, pero conforme avanzó la esporulación apareció el color negro; mientras que el reverso de la colonia fue de color amarillo claro. La textura de la colonia es granular, casi polvoriento, con una topografía aplanada ([Figura 9a](#)).

#### **Características microscópicas**

El microorganismo presentó hifas bien desarrolladas y ramificadas y conidióforos en abundancia. Con conidióforos largos y erectos, terminados en vesículas subesféricas con un gran número de fiálides<sup>3</sup> en su superficie, por lo que se observan como cabezas conidiales radiadas. Está presente la métula<sup>4</sup> y su tamaño es dos veces el tamaño de las fiálides ([Figura 9b](#)). Conidios globosos de color marrón. Debido a que los conidióforos y los conidios se producen abundantemente, su color negro o marrón predomina en la pigmentación de la colonia.

---

<sup>3</sup> Tipo de célula conidiógena, en forma de botella, que produce conidios (Herrera y Ulloa, 1990).

<sup>4</sup> Ramita del conidióforo que origina fiálides o células conidiógenas (Herrera y Ulloa, 1990).

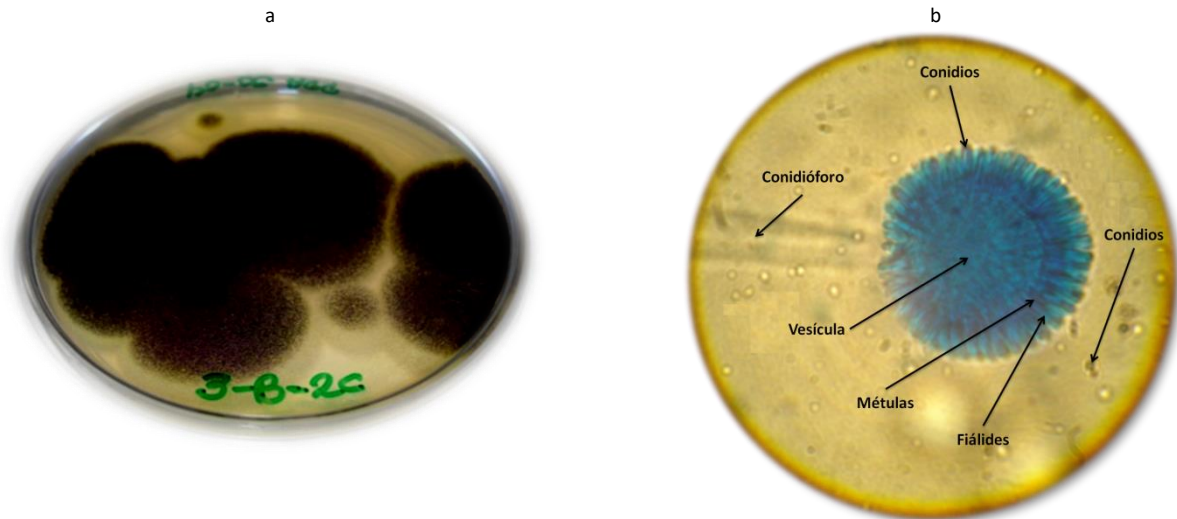


Figura 9. *Aspergillus niger*. 7a. Anverso de un cultivo de *A. niger* en medio Papa-Dextrosa-Agar de 7 días. 7b. Micrografía de *A. niger* mostrando las estructuras reproductoras asexuales (100X).

Fuente: Autora.

### **Género *Fusarium***

Pertencen a la clase *Ascomycetes*, orden *Hypocreales*, familia *Hypocreaceae* (Barnett y Barry, 1998). Las especies del género *Fusarium* producen dos tipos de conidios, denominados macroconidios y microconidios a partir de fiálides. Los primeros son largos y curvados, multiseptados, en forma de creciente lunar, con una célula apical más o menos puntiaguda y en muchas especies con una célula basal en forma de pie. Los microconidios generalmente son unicelulares y de forma ovalada o esferoidal, similares en ancho a los macroconidios, con una base redondeada o truncada. No siempre se producen ambos tipos de espora (Herrera y Ulloa, 1990; Carrillo, 2003).

### ***Fusarium solani***

#### **Características macroscópicas**

En términos generales el micelio es ralo y aterciopelado como un fieltro con topografía aplanada. En medio de cultivo PDA la forma de la colonia se desarrolló de forma circular y el anverso de la colonia presentó zonas concéntricas de distinto color. Inició con un anillo central rosa pálido que se difuminó en blanco; el anillo exterior presentó tonalidades rosáceas. El centro del reverso de la

colonia fue de color café durazno y se desvaneció hasta adquirir una coloración ámbar en el exterior (Figura 10).



Figura 10. Anverso de un cultivo de *Fusarium solani* en medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA) de 7 días.  
Fuente: Autora.

### Características microscópicas

*F. solani* presenta conidióforos con fiálides que se afilan hacia la punta con collares poco definidos (Figura 11a). Las fiálides pueden encontrarse solitarias o reunidas. Los macroconidios son multiseptados encontrándose de 2 a 5 tabiques con forma de media luna y más anchos en la mitad superior (Figura 11b). Los microconidios son menos abundantes y ovales, se les encuentra mezclados con una mayor cantidad de macroconidios. Los microconidios aislados en cabezuelas, ocasionalmente contienen un tabique (Figura 11c).

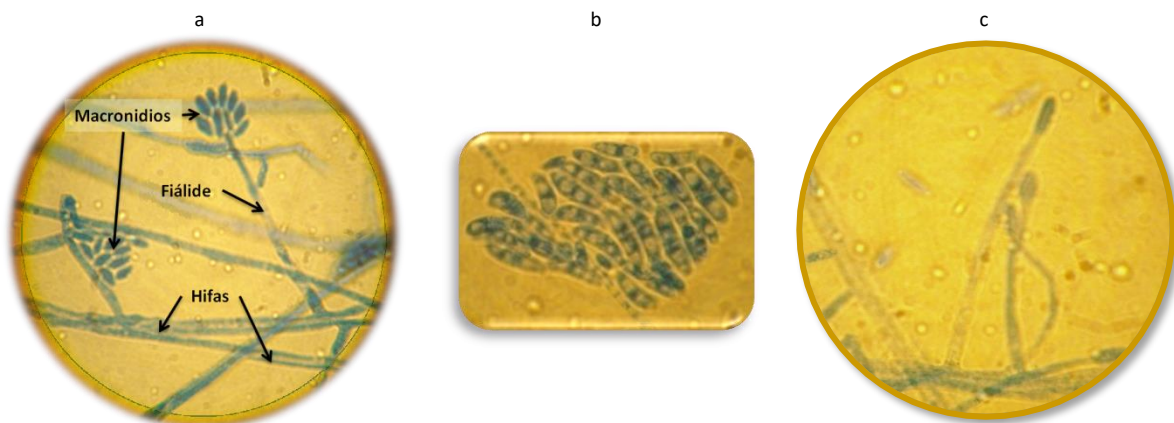


Figura 11. *Fusarium solani*. 9a. Micrografía de *F. solani* mostrando las estructuras reproductoras asexuales (100X). 9b. Macroconidios de *F. solani* con múltiples septos (100X). 9c. Fiálides solitarias largas productoras de microconidios (100X).  
Fuente: Autora.

## ***Fusarium oxysporum***

### **Características macroscópicas**

La colonia de *F. oxysporum* se desarrolló de forma circular, inicialmente el micelio mostró una textura algodonosa y terminó como el fieltro. La topografía fue aplanada. El anverso de la colonia en PDA presentó una coloración homogénea entre rosa y salmón pálido (Figura 12), mientras que el reverso presentó una coloración que de rosa pálido a púrpura claro.



Figura 12. Anverso de un cultivo de *Fusarium oxysporum* en medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA) de 7 días.  
Fuente: Autora.

### **Características microscópicas**

Los conidióforos presentan fiálides, que igual que en *F. solani*, se afilan hacia la punta en collares poco definidos. Las fiálides se pueden presentar solitarias o en agrupaciones ramificadas. Los macroconidios son multiseptados en forma de media luna (Figura 13a); mientras que los microconidios son menos abundantes y de forma oval, con uno o dos septos. Se distingue de *F. solani* por su fiálides productoras de microconidios más cortas (Figura 13b).

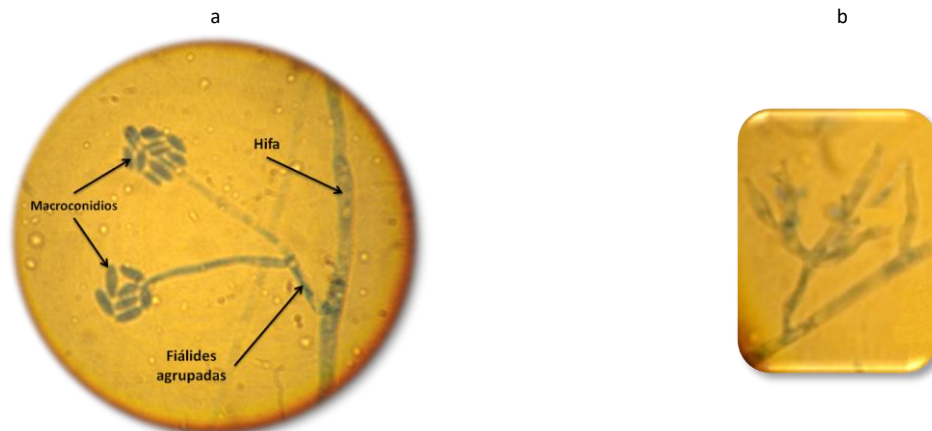


Figura 13. *Fusarium oxysporum*. 11a. Micromorfología de una colonia de *F. oxysporum* mostrando las estructuras reproductoras asexuales (100X). Figura 11b. Micromorfología de una colonia de *F. oxysporum* destacando las fiálides productoras de microconidios (100X).  
Fuente: Autora.

## **Levaduras**

### ***Candida orthopsilosis***

#### **Descripción general**

El género *Candida* pertenece a la clase *Blastomycetes*, orden *Moniliales* y familia *Cryptocicaceae*. Se encuentra distribuido ampliamente en el ambiente y también coloniza al ser humano y a otros mamíferos. Es un hongo dimórfico que se encuentra en forma de levadura cuando está en el estado saprófito, en tanto que en el estado parasitario forma filamentos de longitud variable (Carrillo, 2003; Herrera y Ulloa, 1990).

#### **Morfología colonial**

Colonias de forma convexa con ligera elevación, bordes enteros circulares de 5 mm a las 24 h, superficie suave y lisa de color blanco o crema (Figura 14).

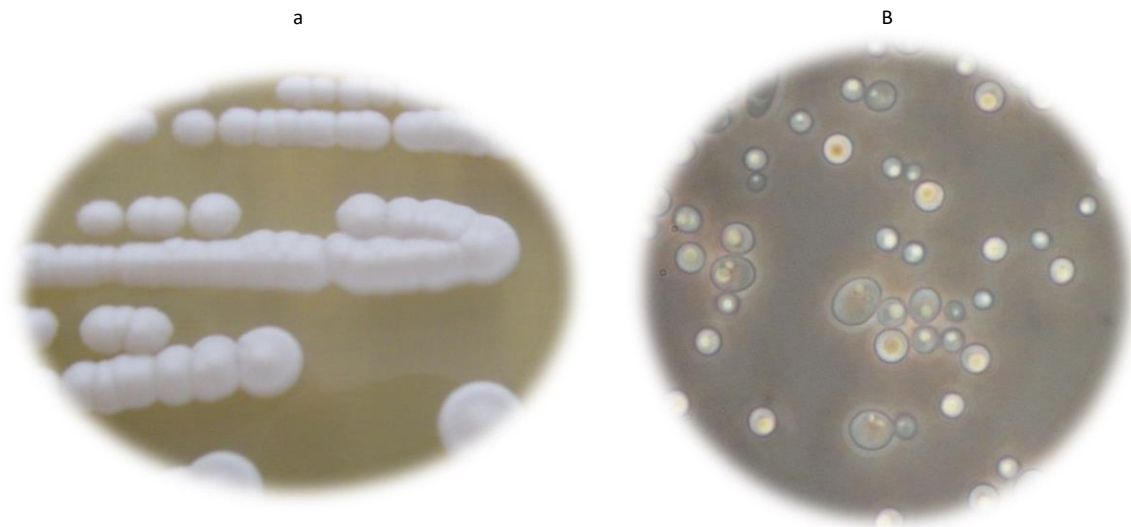


Figura 14. *Candida orthopsilosis*. 12a. Morfología colonial de *C. orthopsilosis* en medio Yeast-Mold (YM) a las 72 h. 12b. Morfología celular de *C. orthopsilosis* (40X).

Fuente: Autora.

### ***Rhodotorula mucilaginosa***

#### **Descripción general**

El género *Rhodotorula* pertenece al filo *Basidiomycota*, clase *Urediniomycetes*, orden *Sporidiales* y familia *Sporidiobolaceae*. Es un habitante común del ambiente, se encuentra en diversas matrices ambientales como aire, suelo y aguas de océano. Forma parte de la microflora comensal de la piel,

uñas y membranas mucosas de los seres humanos y puede colonizar plantas y otros mamíferos. Son células mucoides, encapsuladas y fermentan azúcar. Se distingue por la producción de pigmentos carotenoides, los cuales confieren a las colonias una coloración rosa o rojiza que bloquea ciertas longitudes de onda (620-750 nm) para evitar daño celular. *Rhodotorula mucilaginosa* puede encontrarse en reservorios de agua dulce o salada, permanentes o estacionales, así como en ríos o arroyos. También es la especie más frecuentemente asociada a infecciones humanas (Carrillo, 2003; Herrera y Ulloa, 1990).

### Morfología colonial

Colonias de color rojo coral, lisas, mucosas y brillantes, de forma convexa con ligera elevación, bordes enteros circulares de 5 mm a las 24 h (Figura 15).

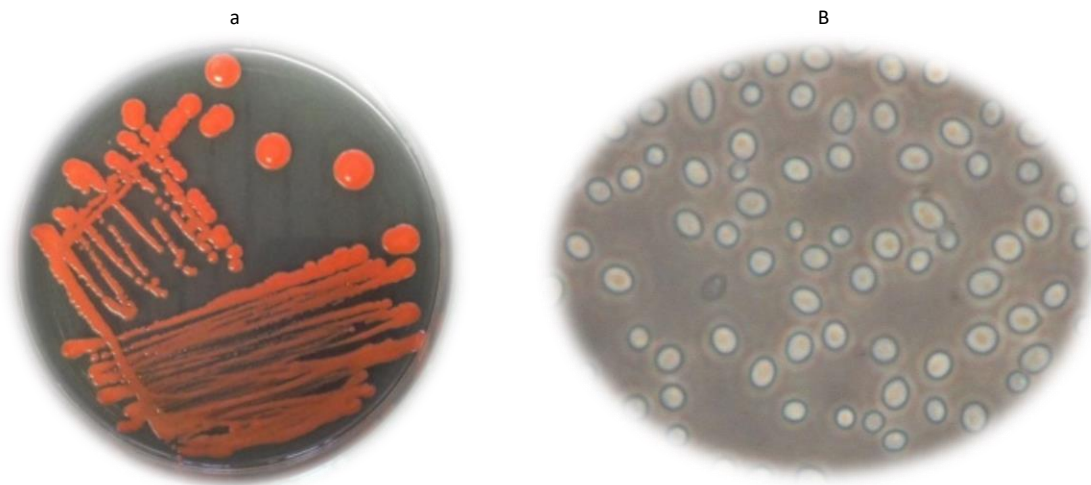


Figura 15. *Rhodotorula mucilaginosa*. 13a. Morfología colonial de *R. mucilaginosa* en medio Levadura-Peptona-Glucosa (YPG) a las 48 h (40X). 13b. Morfología celular de *R. mucilaginosa* (40X).  
Fuente: Autora.

## Bacterias

### *Klebsiella variicola*

#### Descripción general

*Klebsiella* es un género de bacterias gram-negativas inmóviles, anaerobios o anaerobios facultativos. Pertence a la clase *Gamma proteobacteria*, orden *Enterobacteriales* y familia *Enterobacteriaceae*, por lo que es un frecuente patógeno humano. La capa más externa está formada por una gran



cápsula de polisacáridos, que diferencia a estos microorganismos de otros géneros de esta familia (Madigan *et al.*, 2004).

*Klebsiella variicola* tiene la capacidad de fijar nitrógeno por lo que suele utilizarse como control positivo para evaluar bioquímicamente la actividad enzimática de la nitrogenasa en aislados.

### Morfología colonial y celular

Colonias de forma circular de 2-3 mm, bordes enteros a las 24 h, superficie plana y lisa de color pardo, pigmentación no difusible y consistencia mucosa (Figura 16a). Células de forma bacilar cortos, no móviles, sin la presencia de esporas (Figura 16b).

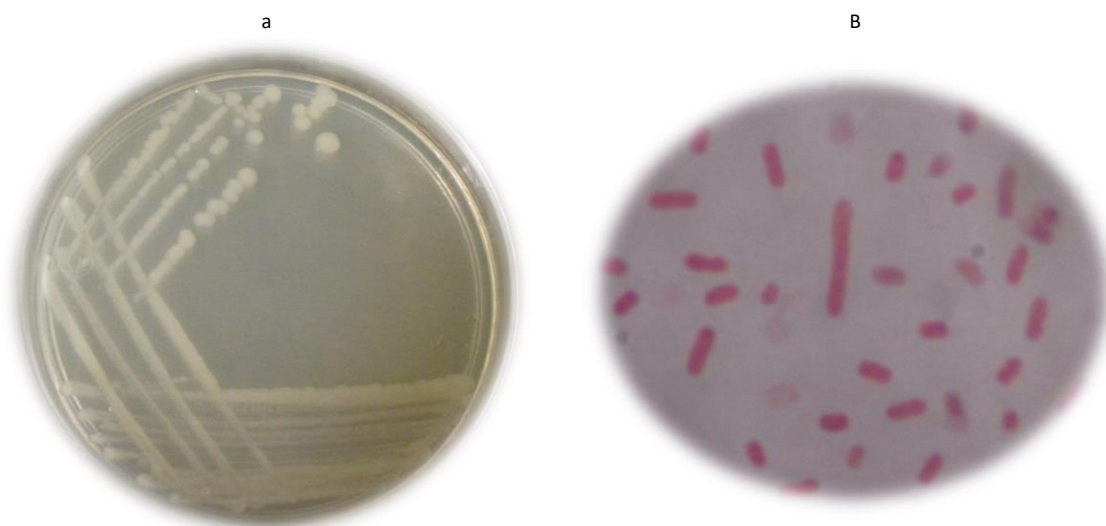


Figura 16. *Klebsiella variicola*. 14a. Morfología colonial de *K. variicola* en Agar Nutritivo (AN) a las 48 h (100X). 14b. Morfología celular de *K. variicola* (100X).

Fuente: Autora.

### *Pseudomonas putida*

#### Descripción general

El género *Pseudomonas* es una bacteria Gram-negativa con motilidad positiva gracias a su flagelo que no forma esporas. Es un bacilo curvo o recto, se puede encontrar aislado o en parejas o formando cadenas cortas. Es catalasa positivo por lo que puede catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. Algunas especies sintetizan una cápsula de exopolisacáridos que facilita la adhesión celular y la formación de biopelículas. Es una de las principales bacterias oportunistas causantes de infecciones intrahospitalarias. Pertenece a la clase

*Gamma proteobacteria*, orden *Pseudomonadales* y familia *Pseudomonadaceae* (Madigan *et al.*, 2004).

*Pseudomonas putida* se encuentra en la mayoría de los hábitats de suelo y agua donde hay oxígeno. Es una de las especies de mayor interés industrial entre las bacterias del género *Pseudomonas* porque además de su potencial para degradar compuestos aromáticos y xenobióticos, presenta la capacidad de colonizar el sistema radicular de las plantas, formar biopelículas y ser manejable desde el punto de vista genético.

### Morfología colonial y celular

Colonias de forma circular de 2-3 mm, bordes irregulares a las 24 h, superficie plana y de color crema, pigmentación no difusible y consistencia mucosa (Figura 17a). Células de forma bacilar solas, móviles, sin la presencia de esporas (Figura 17b).

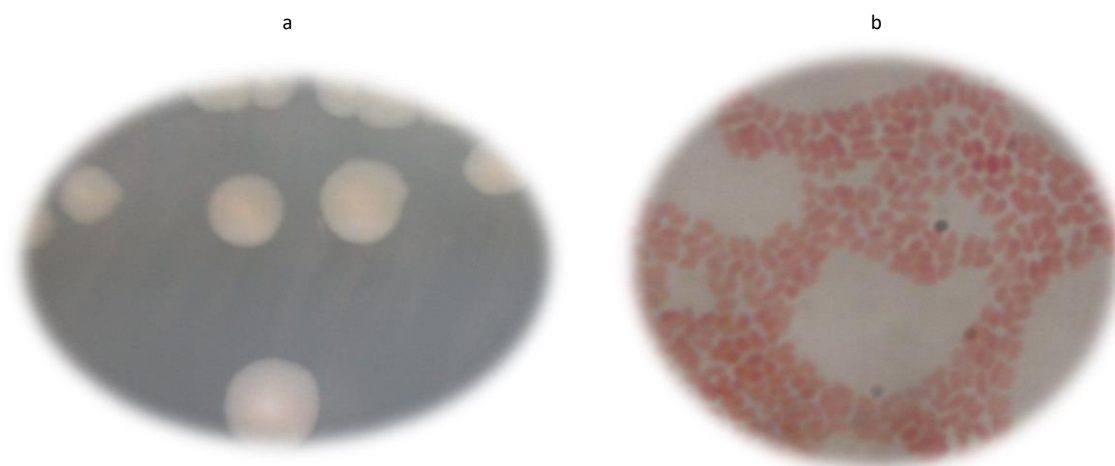


Figura 17. *Pseudomonas putida*. 15a. Morfología colonial de *P. putida* en Agar Nutritivo (AN) de 48 h. 15b. Morfología celular de *P. putida* (100X).  
Fuente: Autora.

## 8.2 Segunda etapa: Principales factores que favorecen la degradación de hidrocarburos

### 8.2.1 Producción del inóculo del grano verde de café

El primer paso de esta etapa consistió en producir el inóculo necesario para los experimentos de degradación de hidrocarburos empleando el grano verde de café (GVC). Para ello se molieron 1.9 kg de grano verde de café en una licuadora Waring, obteniéndose cinco tamaños de partícula. Las

fracciones obtenidas se caracterizaron en cuanto al contenido de humedad, contenido de cenizas y actividad del agua. Posteriormente se realizó un diseño factorial  $3^2$  para determinar las condiciones que favorecen una mayor actividad metabólica.

### **8.2.1.1 Caracterización del grano verde de café**

En la [Tabla 10](#) se presenta la distribución del grano de café según tamaño de partícula así como otras características. Como se puede observar, el 70% de las diferentes fracciones de GVC presentan un diámetro entre 0.86 y 2.0 mm.

Tabla 10. Características del grano de café según tamaño de partícula.

<b>Tamaño de Partícula (TP) (mm)</b>	<b>Distribución del TP (%)</b>	<b>Humedad (%)</b>	<b>Humedad Desviación Estandar</b>	<b>Contenido de Cenizas (%)</b>	<b>Contenido de Cenizas Desviación Estándar</b>
<b>&lt; 0.42</b>	13.12	7.01	± 0.12	0.0461	± 0.0029
<b>0.42 - 0.86</b>	15.59	5.37	± 0.39	0.0418	± 0.0033
<b>0.86 - 2.0</b>	69.69	2.99	± 0.39	0.0384	± 0.0014
<b>&gt; 2.0</b>	1.59				

Para cada tamaño de partícula se cuantificó la humedad y el contenido de cenizas. En términos generales a menor tamaño de partícula, mayor humedad ([Tabla 10](#)). Lo anterior podría deberse a que el grano de café de menor tamaño de partícula sea más poroso y absorba mayor humedad del aire. O bien, a que durante el proceso de trituración del grano, se presente un proceso diferencial de molido del endospermo, de manera que a cada tamaño de partícula le corresponda diferente relación de Endospermo-Externo-Duro:Endospermo-Interno-Suave y cada tipo de endospermo absorba o desorba humedad del aire de manera diferencial. La comparación de medias mediante la prueba Least Significant Difference (LSD) indica que no hay diferencias estadísticas significativas ( $1-\alpha=0.95$ ) en cuanto al contenido de humedad entre los dos tamaños de partícula más grandes, que son las más duras al tacto.

En relación al contenido de cenizas, la comparación de medias indica que no existen diferencias estadísticas significativas ( $1-\alpha=0.95$ ) entre dos o tres tamaños de partícula contiguos. Las mayores diferencias se presentan entre las partículas más pequeñas y las más grandes ([Tabla 10](#)). La medición del contenido de cenizas es útil en el análisis de alimentos, ya que se pueden determinar diversos

minerales contenidos en la muestra. Los minerales forman parte de la composición química de lípidos y proteínas, lo que indica que las diferencias en el contenido de minerales según tamaño de partícula no son muy grandes.

### **8.2.1.1 Producción del inóculo a partir de respirometría, con el uso de un diseño factorial 3<sup>2</sup>**

De experimentos preliminares y de los realizados por Ramírez-Castillo (2009) se determinó que el tamaño de partícula (TP) del grano de café y la humedad tienen un efecto significativo en la actividad microbiana, por lo que se decidió juntar las fracciones con tamaños de partícula entre 0.42 a 0.59 y 0.59 a 0.86 mm en una fracción debido a los bajos porcentajes de distribución de éstas y trabajar con tres niveles.

Los resultados de  $a_w$  del grano verde de café para los tres tamaños de partícula son menores a 0.30 (Tabla 11). En general, el límite inferior de  $a_w$  para el crecimiento microbiano es 0.91 para la mayoría de las bacterias, 0.88 para la mayoría de las levaduras y 0.80 para la mayoría de los hongos. Algunas bacterias halófilas y levaduras osmófilas pueden crecer con valores de  $a_w$  de 0.75 y 0.60, respectivamente. Por debajo de 0.60 no hay crecimiento microbiano. Los microorganismos colonizadores del café podrían encontrarse en los granos antes de ser cosechados y persistir durante los procesos de descascarillado hasta el almacenamiento. Como la actividad del agua es tan baja, no proliferan hasta que se añade agua. La persistencia de los microorganismos bajo estas condiciones podría deberse a la presencia de estructuras de resistencia que les permite sobrevivir a condiciones adversas y permanecer en condiciones de latencia (Herrera y Ulloa, 1990).

Tabla 11. Actividad del agua ( $a_w$ ) del grano verde de café, según tamaño de partícula (TP).

TP (mm)	$a_w$
< 0.42	0.269 ± 0.005
0.42 – 0.86	0.274 ± 0.006
0.86 – 2.0	0.281 ± 0.008

Para producir el inóculo se planteó un diseño factorial simple 3<sup>2</sup> con dos factores a tres niveles. El objetivo de este experimento consistió en determinar las condiciones ambientales que permitan la mayor actividad microbiana por la determinación de dióxido de carbono, parámetro asociado al crecimiento de los microorganismos. Como factores se definieron el TP del grano verde de café y el porcentaje de humedad (expresado en términos de la CRA) y como variables de respuesta la

producción de CO<sub>2</sub> (%CO<sub>2</sub>/g café) y el cociente respiratorio. En este diseño, cada factor se estudia a tres niveles y los experimentos contemplan todas las combinaciones de cada nivel de un factor con todos los niveles de los otros factores. La siguiente tabla (Tabla 12) muestra los factores y el dominio experimental para cada uno. Todos los experimentos se realizaron por triplicado para un total de 27 unidades experimentales (UE).

Tabla 12. Factores y dominio experimental para la producción del inóculo.

Inóculo	Humedad (%CC)	TP* (mm)
I1	20	< 0.42
I2	20	0.42 - 0.86
I3	20	0.86 - 2.0
I4	30	< 0.42
I5	30	0.42 - 0.86
I6	30	0.86 - 2.0
I7	40	< 0.42
I8	40	0.42 - 0.86
I9	40	0.86 - 2.0

TP = Tamaño de partícula.

Para los inóculos con un TP menor a 0.42 mm, la mayor producción de dióxido de carbono se presenta entre los días 2 y 3; a partir del cuarto día, ya no se observaron cambios (Gráfico 3). A las 24 h de incubación la actividad respiratoria fue mayor en los inóculos con un nivel intermedio (I4, 13.23% ±0.592 CO<sub>2</sub>/g GVC) y alto (I7, 14.82% ±0.539 CO<sub>2</sub>/g GVC) de humedad, con aproximadamente un 10% más de CO<sub>2</sub>/g GVC con respecto al inóculo con nivel bajo de humedad (I1). La prueba LSD muestra que en el primer día existen diferencias estadísticas significativas entre los tres inóculos ( $\alpha=0.05$ ). En el segundo y tercer día de incubación, la actividad microbiana fluctuó en los inóculos con nivel bajo y alto de humedad (I1 y I7); mientras que el inóculo 4, con nivel intermedio de humedad (30% de CRA), presenta mayor estabilidad a lo largo de todo el periodo de incubación y mejor reproducibilidad.

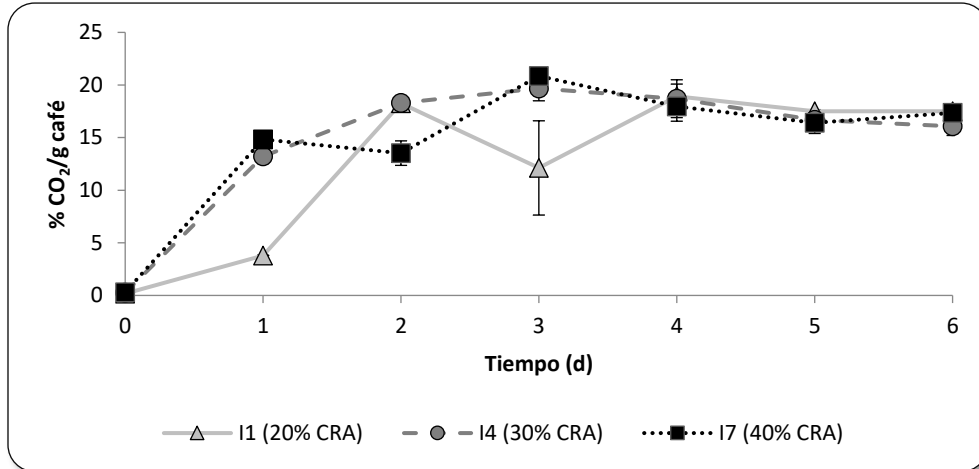


Gráfico 3. Producción de dióxido de carbono, según contenido de humedad, para inóculos con un nivel bajo de tamaño de partícula (< 0.42 mm).

El efecto del contenido de humedad en los inóculos con nivel de TP intermedio (0.42 a 0.86 mm) y alto (0.86 a 2.0 mm) es más notable (Gráfico 4). En ambos casos, a mayor contenido de humedad, mayor producción de dióxido de carbono y mayor actividad microbiana. En los inóculos con un nivel de partícula intermedio la mayor producción de dióxido de carbono (22.41%  $\pm$  1.12 CO<sub>2</sub>/g GVC) se obtiene durante el primer día de incubación con el inóculo con nivel alto de humedad (I8); mientras que los inóculos 2 y 5 (20 y 30% de la CRA, respectivamente) alcanzan la máxima actividad respiratoria en el segundo día. La comparación de medias indica que hay diferencias estadísticas significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre los tres inóculos en el primer día de incubación. La diferencia porcentual en la producción de dióxido de carbono entre I8 e I5 es de 9.43% y entre I8 e I2 de 20.44%.

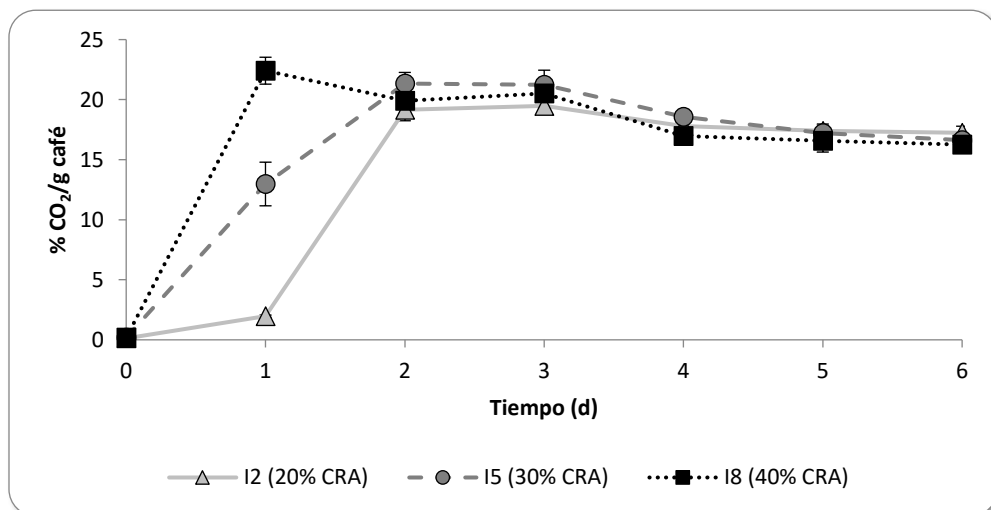


Gráfico 4. Producción de dióxido de carbono, según contenido de humedad, para inóculos con un nivel intermedio de tamaño de partícula (0.42 - 0.86 mm).

Los inóculos con un nivel alto de TP (0.86 - 2.0 mm) alcanzan la mayor producción de dióxido de carbono entre el segundo y cuarto día de incubación, con un desfase de aproximadamente 24 h (Gráfico 5). La mayor actividad microbiana para el inóculo con nivel alto de humedad (I9) se presenta en el segundo y tercer día ( $20.67\% \pm 0.171$  y  $21.12\% \pm 0.021$   $\text{CO}_2/\text{g GVC}$ , respectivamente); mientras que para el inóculo con nivel intermedio de humedad (I6) se presenta en el día 3 ( $20.42\% \pm 1.569$   $\text{CO}_2/\text{g GVC}$ ). El inóculo con nivel bajo de humedad (I3) alcanza la mayor producción de dióxido de carbono en el cuarto día de incubación ( $14.92\% \pm 3.071$   $\text{CO}_2/\text{g GVC}$ ). En el primer día de incubación, I9 presenta diferencias estadísticas significativas con respecto a I3 e I6; mientras que en el segundo día, estos tres inóculos difieren significativamente entre sí ( $\alpha=0.05$ ).

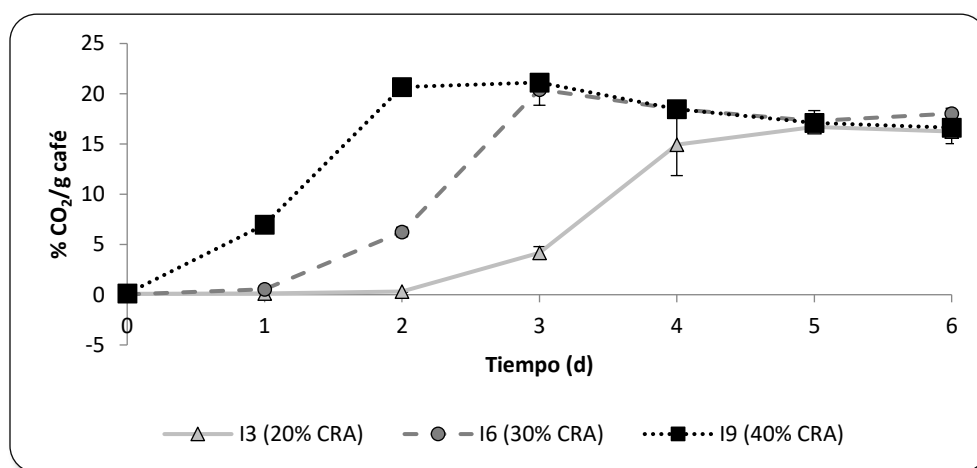


Gráfico 5. Producción de dióxido de carbono, según contenido de humedad, para inóculos con nivel alto de tamaño de partícula (0.86 y 2.0 mm).

En términos operativos, son más recomendables los inóculos que promueven una mayor actividad microbiana a menor tiempo de incubación debido a que se incurre en menores gastos de operación. El inóculo con mayor actividad microbiana a las 24 h se obtuvo con el inóculo I8 ( $22.41\% \pm 1.12$   $\text{CO}_2/\text{g GVC}$ ), seguido de I7 ( $14.82\% \pm 0.539$   $\text{CO}_2/\text{g GVC}$ ), ambos con un contenido de humedad del 40% y un TP de intermedio y bajo, respectivamente. Existen diferencias estadísticas significativas entre estos dos inóculos ( $\alpha=0.05$ ). A las 48 h, el inóculo I5 presenta la mayor producción de dióxido de carbono ( $21.33\% \pm 0.928$   $\text{CO}_2/\text{g GVC}$ ), seguido del inóculo I9 e I8 ( $20.67\% \pm 0.171$  y  $19.90\% \pm 1.666$   $\text{CO}_2/\text{g GVC}$ , respectivamente), con diferencias significativas entre el inóculo I5 y el I8 ( $\alpha=0.05$ ). El primero posee un nivel intermedio de humedad y de TP, mientras que el segundo un nivel alto de humedad y de TP.

En el Gráfico 6, se muestra el efecto de la interacción de los factores TP y contenido de humedad. La mayor producción de dióxido de carbono en el tiempo cero se presenta a niveles altos de humedad y niveles bajos de TP (Gráfico 6a); mientras que entre las 24 y 48 h de incubación, se obtiene a niveles bajos e intermedios de TP y niveles altos de humedad (Gráfico 6b y Gráfico 6c).

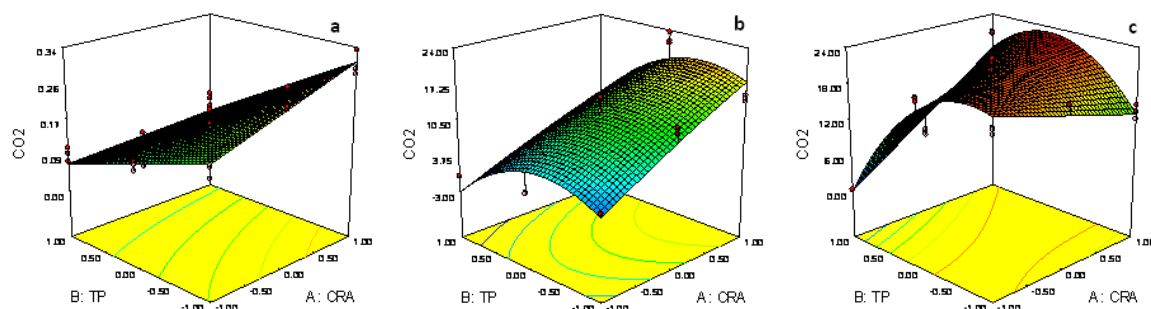


Gráfico 6. Efecto de la interacción entre los factores tamaño de partícula (TP) y contenido de humedad (CRA) en la producción de dióxido de carbono a tiempo inicial (10a), 24 h (10b) y 48 h (10c) de incubación.

El análisis de varianza y los gráficos de Superficie-Respuesta mostraron que los factores con mayor efecto en la actividad microbiana a las 0 h de incubación fueron el TP, contenido de humedad y la interacción entre los dos factores ( $p < 0.0001$ ,  $p = 0.0002$  y  $p = 0.0236$ , respectivamente). A las 24 h, los factores más significativos son el TP, su término cuadrático y el contenido de humedad ( $p < 0.0001$ ,  $p = 0.0001$  y  $p < 0.0001$ , respectivamente), no siendo significativa la interacción entre los dos factores. A las 48 h de incubación, tanto el TP como el contenido de humedad, la interacción entre estas dos variables y el término cuadrático del TP mostraron un efecto significativo ( $p < 0.0001$  en todos los casos) en la generación de dióxido de carbono. A partir del tercer día de incubación, el término de Fisher (F) de los respectivos modelos, indica que ningún factor es significativo.

Muchos de los microorganismos asociados al grano del café colonizan las cerezas<sup>5</sup> antes de ser cosechadas y persisten hasta el almacenamiento del mismo. Como la actividad del agua del GVC empleado es tan baja ( $0.275 \pm 0.006$ ), no proliferan hasta que se incrementa el contenido de humedad de los granos mediante la adición de agua (Sautour *et al.*, 2002; Fontana, 2008). La CRA del GVC con nivel bajo e intermedio de TP ( $3.120 \pm 0.08$  y  $3.201 \pm 0.1$  mL/g GVC, respectivamente) es muy superior a la del café con nivel alto ( $1.742 \pm 0.03$  mL/g GVC). Lo anterior explica la mayor

<sup>5</sup> Término empleado para hacer referencia a los frutos del café que en la madurez adquieren un color rojo a amarillo. Cada cereza tiene una piel exterior (exocarpio) que envuelve una pulpa dulce (mesocarpio). Debajo de la pulpa se encuentran las semillas de las cerezas, es decir los granos de café. Cada cereza contiene en general dos granos de café.



actividad microbiana de los tratamientos con nivel bajo e intermedio de TP y con nivel alto de humedad en los primeros días de incubación.

Silva y colaboradores (2000, 2008) estudiaron la sucesión de comunidades microbianas durante la fermentación natural del café Arabica y encontraron que la diversidad y número de individuos por especie durante la sucesión ecológica estuvo influenciada principalmente por el contenido de humedad de las cerezas y del grano de café.

El hecho de que ni el TP ni el contenido de humedad sean significativos a partir del tercer día de incubación, podría estar relacionado con otros factores que inciden en la sucesión microbiana como la capacidad enzimática de las especies colonizadoras para competir exitosamente por sustratos. Los carbohidratos, los principales componentes del GVC se encuentran en forma de polisacáridos y como azúcares de bajo peso molecular. La fracción polisacárida constituye alrededor del 50% del peso seco y los azúcares de bajo peso molecular del 5 a 7% (Redgwell y Fischer, 2006). Al inicio de la fermentación, cuando están disponibles los azúcares simples y la humedad del sistema es más elevada, se podría favorecer el crecimiento de las bacterias sobre las levaduras y hongos. Debido a su crecimiento más acelerado, las bacterias reducirían la disponibilidad de estos carbohidratos, por lo que los polímeros complejos se convertirían en la principal fuente de carbono y en el factor determinante de la actividad microbiana a partir del tercer día. Conforme disminuyen los azúcares de bajo peso molecular y el agua disponible para el crecimiento de las bacterias, crecen gradualmente los microorganismos que poseen los sistemas enzimáticos necesarios para degradar los polisacáridos. De los tres grupos de microorganismos presentes en los granos de café, algunas bacterias del género *Bacillus* poseen enzimas extracelulares capaces de degradar la celulosa y la pectina (Silva *et al.*, 2008). Entre las levaduras con actividad pectinolítica destacan *Pichia*, *Debaryomyces* y *Arxula* (Masoud y Jespersen, 2006; Silva *et al.*, 2008); mientras que entre los hongos filamentosos degradadores de polisacáridos del café sobresalen los géneros *Penicillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Hypocrea*, *Fusarium* y *Gibeberella*, entre otros (Fujii y Takeshi, 2007). Los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* fueron aislados mediante enriquecimiento secuencial empleando diesel como fuente de carbono (Sección 8.1).

### **8.2.2 Pruebas de recuperación de fenantreno**

Para las pruebas de recuperación de Phe se emplearon concentraciones de 100, 150 y 200 mg/L. Se decidió utilizar Phe en lugar del diesel, debido a que este último posee componentes volátiles que

no pueden ser recuperados y para preparar diesel meteorizado se requiere someterlo a altas temperaturas bajo una atmósfera de nitrógeno. El Phe es un hidrocarburo modelo poliaromático que posee tres anillos bencénicos en su estructura y el diesel contiene un 35% de compuestos aromáticos.

Los resultados de las pruebas de recuperación de Phe empleando agua destilada se muestran en el Gráfico 7. Aunque el promedio de recuperación es mayor para concentraciones de 150 mg/L, la comparación de medias (LSD) indica que no hay diferencias estadísticas significativas entre 150 y 200 mg/L, ni entre 100 y 200 mg/L. Las pruebas se realizaron por triplicado, siendo el promedio general de recuperación de 91.2%. La comparación de medias indica que existen diferencias estadísticas significativas ( $\alpha=0.05$ ) en las pruebas de recuperación de Phe en agua de mar (Gráfico 8). A mayor concentración del contaminante mayor porcentaje de recuperación. El promedio general de recuperación fue de 88.2%.

Los porcentajes de recuperación de Phe en agua de mar son más bajos que los obtenidos en agua destilada, con excepción del tratamiento con nivel más alto de contaminante. No obstante lo anterior, la prueba LSD indica que únicamente existen diferencias estadísticas significativas ( $\alpha=0.05$ ) en la recuperación de Phe entre tratamientos con agua destilada y agua de mar en la concentración más baja (100 mg/L). Como la diferencia entre los tratamientos con 200 mg/L de Phe es menor que entre los tratamientos con 150 mg/L, se decide emplear la concentración más alta en los experimentos de degradación.

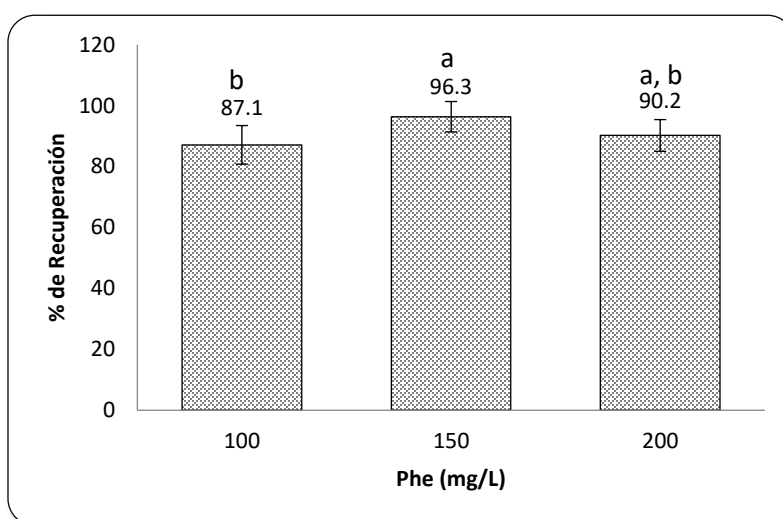


Gráfico 7. Porcentaje de recuperación de fenantreno (Phe) en agua destilada  
Comparación de medias con LSD. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

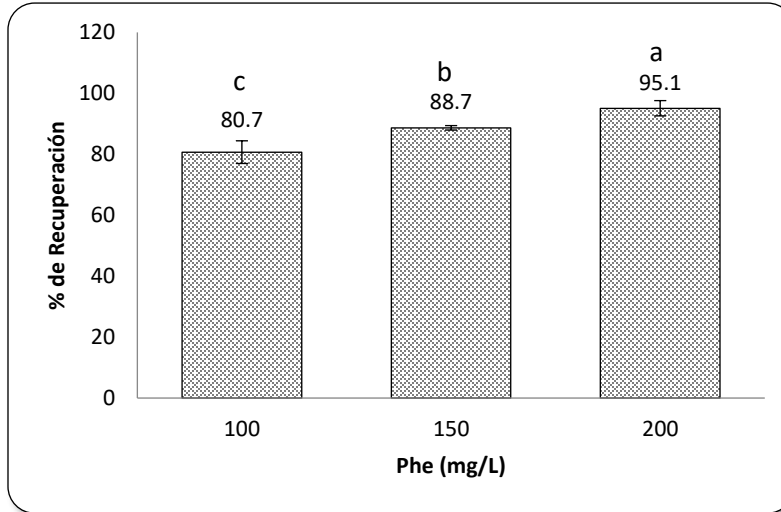


Gráfico 8. Porcentaje de recuperación de fenantreno (Phe) en agua de mar. Comparación de medias con LSD. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

### 8.2.3 Pruebas de actividad enzimática

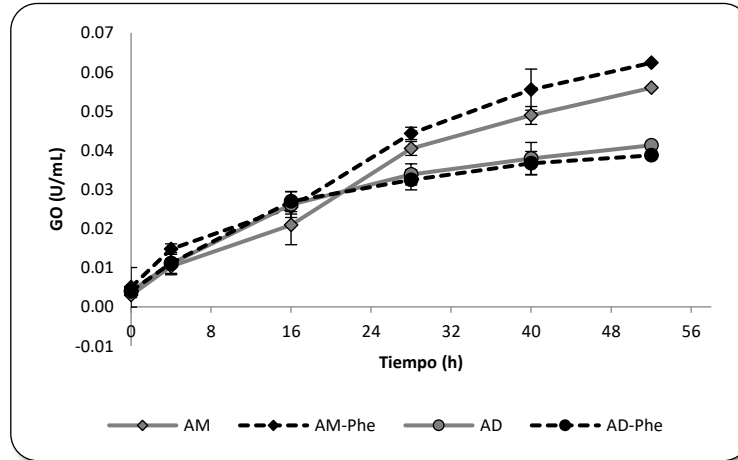
El objetivo de esta actividad consistió en determinar si el Phe tiene algún efecto en la actividad de las enzimas glucosa oxidasa (GO) y galactosa oxidasa (GAO). Los experimentos se realizaron tanto en agua destilada (AD) como en agua de mar (AM). Los resultados de esta prueba muestran que en las primeras 16 h de incubación la actividad volumétrica de la enzima GO es muy similar en los cuatro tratamientos (Gráfico 9a). A partir de las 28 h de cultivo incrementa la actividad volumétrica de los cultivos en agua de mar, siendo ligeramente mayor en los tratamientos con contaminante (AM-Phe). Existen diferencias estadísticas significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre estos tratamientos a las 16 y 40 h. No se presentan diferencias estadísticas significativas ( $1-\alpha=0.95$ ) en los cultivos en agua destilada a lo largo de todo el periodo de incubación.

La proteína total extracelular es considerablemente mayor en los cultivos en agua destilada que en los de agua de mar (Gráfico 9b) con diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) a lo largo de todo el periodo de incubación. Sin embargo, no se presentan diferencias estadísticas significativas ( $1-\alpha=0.95$ ) entre los tratamientos con y sin fenantreno.

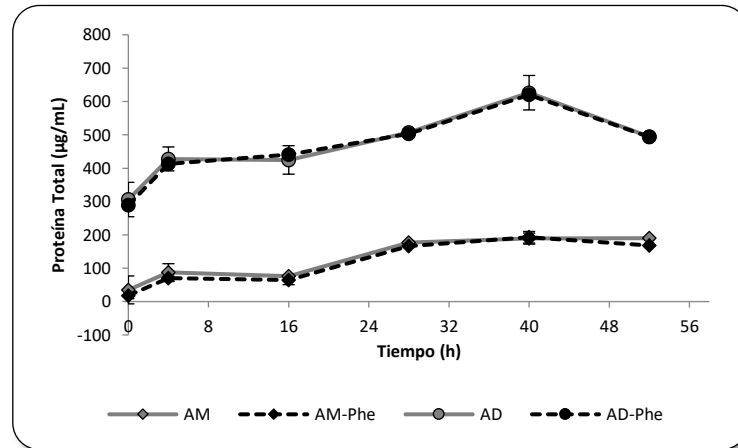
La actividad específica de la GO es considerablemente superior en los cultivos en agua de mar (Gráfico 9c). Es posible que el estrés generado por el agua de mar en los microorganismos asociados al grano verde de café ocasione una mayor secreción de la enzima GO en relación con la proteína total extracelular. No se presentan diferencias ( $1-\alpha=0.95$ ) entre los tratamientos con y sin Phe en

agua destilada; mientras que los cultivos en agua de mar presentan diferencias estadísticas significativas ( $\alpha=0.05$ ) a partir de las 28 h, siendo ligeramente superior en los cultivos con Phe.

a



b



c

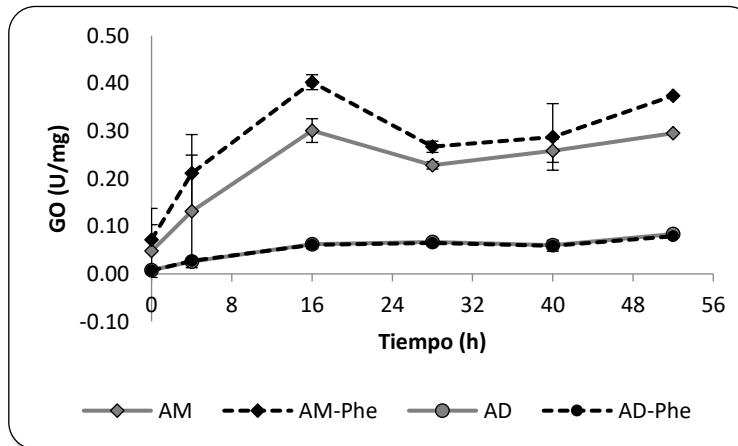


Gráfico 9. Concentración de proteínas. 9a. Actividad volumétrica de la enzima glucosa oxidasa (GO). 9b. Contenido de proteína total extracelular. 9c. Actividad específica de la enzima Glucosa oxidasa. AM = Agua de Mar, AD = Agua Destilada, Phe = tratamientos con 180 mg/L de fenantreno (Phe).

Con respecto a la enzima GAO el agua de mar inhibió la actividad de la enzima y los resultados en agua destilada no fueron concluyentes ya que la mayor parte de las absorbancias se encontraban por debajo de la curva de calibración.

No fue posible determinar si el Phe tiene algún efecto en la actividad de la enzima GO, dado que en términos generales no hay diferencias estadísticas significativas en los cultivos en agua destilada, tanto para la enzima GO como para el contenido de proteína total extracelular y, en los cultivos en agua de mar, únicamente hay diferencias en dos puntos. Lo anterior puede deberse a que el contaminante no estaba disponible para los microorganismos. De manera que, a pesar de que en el inóculo del grano verde de café se han aislado bacterias productoras de biosurfactantes (Velázquez-Aradillas *et al.*, 2010), posiblemente bajo las condiciones de cultivo de este trabajo o bien, los microorganismos no lo produjeron, o la cantidad producida sea tan baja que no fue posible solubilizar el Phe, o 52 horas de cultivo no fueron suficientes para solubilizar el contaminante aunque hubiese producción del biosurfactante. El agua de mar tiene un mayor efecto sobre los microorganismos que el Phe, al inducir una mayor actividad específica de la enzima GO que el contaminante.

No obstante lo anterior, el contenido de proteína total extracelular decae a partir de las 40 horas en los cultivos en agua destilada, indicativo de que el cultivo está en fase de muerte, debido probablemente al agotamiento de la fuente de carbono presente en las partículas del grano verde de café.

#### **8.2.4 Diseño de experimentos Plackett-Burman para determinar los principales factores químicos que favorecen la degradación de fenantreno en agua destilada**

Se realizó un diseño Plackett-Burman con 7 variables (seis nutricionales y un tensoactivo) con el propósito de exponer a los microorganismos asociados al grano de café a diferentes factores químicos y determinar su efecto en la degradación de Phe en agua destilada. En la [Tabla 13](#) se presenta la matriz con los valores naturales de las variables.

Tabla 13. Matriz de experimentos del diseño Plackett-Burman con los valores naturales y codificados de las variables y los valores de degradación de fenantreno.

Trat.	NaNO <sub>3</sub> (mg/L)	Peptona (g/L)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (mg/L)	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g/L)	CaCO <sub>3</sub> (mg/L)	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (mg/L)	Tween 80 al 4% (mL/L)	Degradación [Phe] %	
								4 d	9 d
1	229 (+1)	3 (+1)	16.6 (+1)	0.50 (-1)	200 (+1)	5 (-1)	5 (-1)	33.34	23.25
2	57 (-1)	3 (+1)	16.6 (+1)	1.00 (+1)	150 (-1)	15 (+1)	5 (-1)	25.82	91.92
3	57 (-1)	1 (-1)	16.6 (+1)	1.00 (+1)	200 (+1)	5 (-1)	15 (+1)	27.04	21.16
4	229 (+1)	1 (-1)	8.3 (-1)	1.00 (+1)	200 (+1)	15 (+1)	5 (-1)	26.38	29.60
5	57 (-1)	3 (+1)	8.3 (-1)	0.50 (-1)	200 (+1)	15 (+1)	15 (+1)	36.38	89.33
6	229 (+1)	1 (-1)	16.6 (+1)	0.50 (-1)	150 (-1)	15 (+1)	15 (+1)	16.52	15.61
7	229 (-1)	3 (+1)	8.3 (-1)	1.00 (+1)	150 (-1)	5 (-1)	15 (+1)	79.03	66.70
8	57 (-1)	1 (-1)	8.3 (-1)	0.50 (-1)	150 (-1)	5 (-1)	5 (-1)	0.00	70.18
PCa	143 (0)	2 (0)	12.4 (0)	0.75 (0)	175 (0)	10 (0)	10 (0)	82.00	40.07
PCb	143 (0)	2 (0)	12.4 (0)	0.75 (0)	175 (0)	10 (0)	10 (0)	83.39	34.93
PCc	143 (0)	2 (0)	12.4 (0)	0.75 (0)	175 (0)	10 (0)	10 (0)	83.37	29.33
PCd	143 (0)	2 (0)	12.4 (0)	0.75 (0)	175 (0)	10 (0)	10 (0)	83.69	-

En el Gráfico 10 se presentan los resultados del diseño Plackett-Burman. Cabe destacar que los tratamientos con un asterisco (\*) formaron una fuerte emulsión durante el proceso de extracción líquido-líquido. Como se puede observar todos aquellos tratamientos que formaron emulsiones fuertes presentan una baja concentración de Phe, lo que sugiere una pérdida del contaminante durante el proceso de extracción y no debido a procesos de degradación biótica. No se observa una relación entre las muestras emulsionadas y la concentración del surfactante.

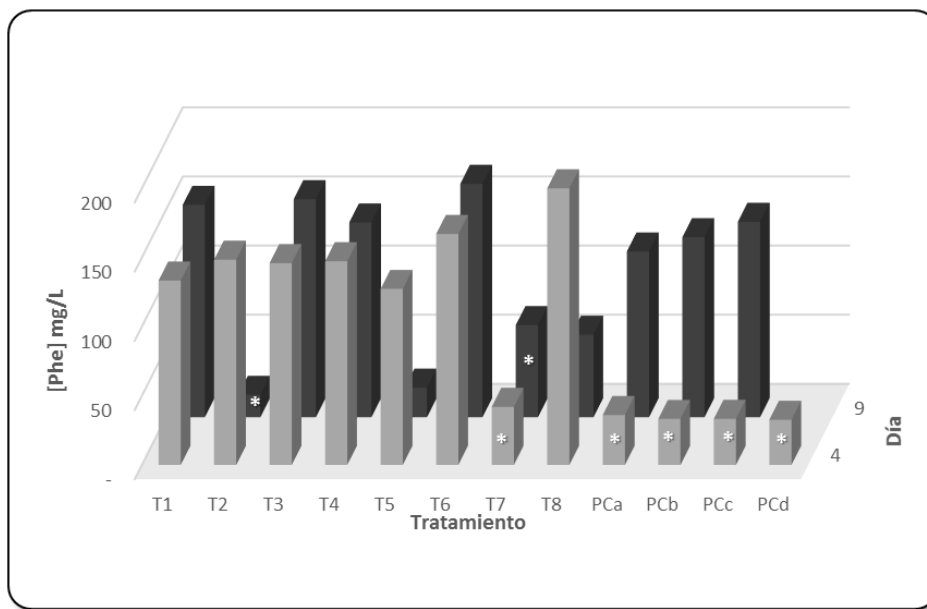


Gráfico 10. Concentración total de fenantreno (Phe) según tratamiento del diseño Plackett-Burman.

Los tratamientos con mayor remoción de Phe, que no formaron emulsiones considerables, son el T5 y T8. Al cuarto día de incubación, el T5 presentó una reducción del 36% (65 mg/L), mientras que al noveno día de cultivo hubo una reducción superior al 89% (161 mg/L). En el T8 no hubo degradación de Phe al cuarto día de cultivo, mientras que en el día nueve, hubo una reducción del 70% (126 mg/L), este resultado podría atribuirse a un proceso de adsorción-desorción.

Las ecuación del análisis de regresión que describe la degradación al día 9 es la siguiente:

$$\text{Phe (ppm)} = + 43.82 - 20.93 * \text{NaNO}_3 + 13.08 * \text{Peptona} - 16.74 * \text{KH}_2\text{PO}_4 + 5.13 * \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 15.02 * \text{CaCO}_3 + 9.40 * \text{FeSO}_4 + 0.99 * \text{Tween 80}$$

Del análisis de varianza y de regresión (Anexo A) se determinó que la degradación al día 4 no fue afectada por ninguno de los factores y por lo mismo no hubo ajuste del modelo a los datos experimentales ( $R^2=0.35$  y  $CV=87.52$ ), lo que podría atribuirse a la interferencia de las emulsiones formadas. Opuestamente, al día 9 el ANOVA y el modelo de regresión, considerando el error tipo I, mostraron que la degradación fue afectada significativamente ( $\alpha<0.05$ ) a baja concentración del  $\text{NaNO}_3$  y del  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $R^2=0.95$  y  $CV=24.97$ ) y, para el error tipo III, sólo el  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y el surfactante Tween no fueron significativos en la degradación del fenantreno. Por lo que para obtener una mayor degradación de Phe, se recomienda reducir las concentraciones de  $\text{NaNO}_3$  y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , que

constituyen las fuentes inorgánicas de nitrógeno y fósforo, respectivamente. La mayor reducción de fenantreno se obtuvo con el tratamiento T5, seguido de T8 a los 9 días ([Tabla 13](#)).

### **8.2.5 Experimento para evaluar la degradación de fenantreno en cultivos en suspensión con grano verde de café**

Posteriormente se realizó un experimento para evaluar el grado de remoción de 200 mg/L de Phe en cultivos con células suspendidas en agua destilada (AD) y en agua de mar (AM). Se utilizaron las condiciones de cultivo del inóculo I8 (nivel medio de tamaño de partícula del GVC y valor alto de humedad) para producir el inóculo (Sección 8.2.1.1) y se decidió emplear un medio de cultivo con una relación C:N 100:10, contemplándose la fuente de carbono (C) presente en el contaminante, el del GVC y el de fuentes primarias como glucosa, levadura y polipeptona (Sección 7.1.2). A matraces de 125 mL de capacidad nominal se adicionaron 40 mL de medio de cultivo, 200 mg/L de Phe y el equivalente al 1% de la biomasa en peso seco de GVC colonizado. Los cultivos se incubaron por 3 días a 28°C y 125 rpm.

Además de los tratamientos (T) se definieron dos controles. El primero, con medio de cultivo y Phe (C1), se empleó para medir las pérdidas debidas a procesos fotoquímicos; mientras que el segundo, con medio de cultivo, biomasa estéril y Phe (C2), para evaluar las pérdidas abióticas por sorción a la biomasa. Los resultados de este experimento se presentan en el [Gráfico 11](#).

La eficiencia de recuperación del contaminante tanto en agua destilada como en agua de mar (C1-AD y C1-AM) fue elevada, siendo del 102.02%  $\pm$ 4.96 y del 107.41%  $\pm$ 8.16, respectivamente ([Gráfico 11](#)). El hecho de que los valores estén por arriba del 100%, se debe a que se trabajó con una curva de calibración muy baja (2 a 12 mg/L) y se tuvieron que realizar varias diluciones, por lo que el error se multiplica. Sin embargo, la comparación de medias indica que no existen diferencias estadísticas ( $1-\alpha=0.95$ ) en la eficiencia de extracción de estos controles.



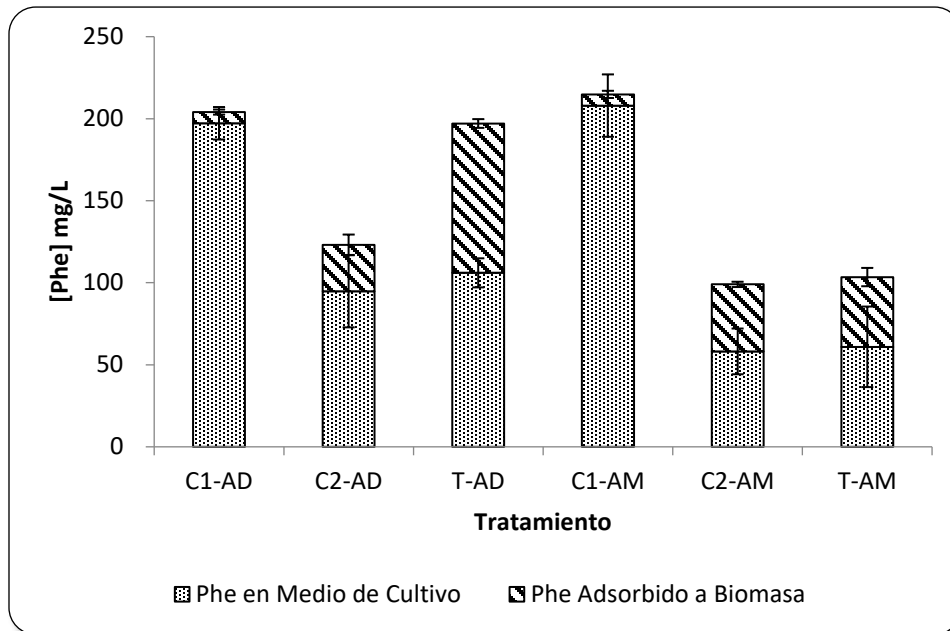


Gráfico 11. Concentración de Fenantreno (Phe) residual en cultivos en suspensión con grano verde de café en agua destilada (AD) y agua de mar (AM) con 3 días de cultivo.  
 C1: control con medio de cultivo y 200 mg/L de Phe; C2: control con medio de cultivo, biomasa estéril y 200 mg/L de Phe; T: tratamiento con medio de cultivo, biomasa y 200 mg/L de Phe.

La remoción del contaminante debida a procesos de sorción a biomasa en cultivos en agua destilada y de mar (C2-AD y C2-AM) fue de  $76.91 \pm 16.39$  y  $100.99 \pm 12.57$  mg/L, respectivamente. La comparación de medias indica que no existen diferencias significativas entre estos controles ( $1-\alpha=0.95$ ).

La remoción asociada a la biomasa activa en agua destilada (T-AD) fue de  $2.92 \pm 10.16$  mg/L, lo que representa en promedio un 1.46%. No hay diferencias estadísticas significativas entre este tratamiento y el control C1-AD ( $1-\alpha=0.95$ ) y, el porcentaje de remoción es muy inferior a la remoción abiótica (C2-AD). En los tratamientos en agua de mar (T-AM) hubo una reducción del contaminante del 48.27% ( $96.54 \pm 21.82$  mg/L) y aunque existen diferencias estadísticas significativas ( $\alpha=0.05$ ) con el control C1-AM, no las hay con respecto a su control abiótico (C2-AM). Existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos en agua destilada (T-AD) y agua de mar (T-AM), lo que sugiere una mayor actividad metabólica en los cultivos en agua de mar. Sin embargo, como la remoción abiótica (C2-AM) en los cultivos en agua de mar es similar al del tratamiento (T-AM), es más factible que la disminución del contaminante en los tratamientos se deba principalmente a procesos de sorción del contaminante a la materia orgánica.

### 8.2.6 Dosis-Respuesta

Como los resultados anteriores no fueron concluyentes, se decidió realizar un experimento Dosis-Respuesta para evaluar la respuesta de los microorganismos asociados al GVC a concentraciones variables de Phe. Se empleó un inóculo de seis días de edad en lugar de 1 día. Se definieron 4 concentraciones de fenantreno (50, 100, 150 y 200 mg/L). El experimento se dividió en dos bloques, en el primero se evaluaron las concentraciones externas y, en caso de que hubiese respuesta favorable del sistema se realizaría el segundo bloque con concentraciones intermedias. Las unidades experimentales se incubaron por 8 días a 28°C y 125 rpm.

Después de ocho días de incubación el porcentaje de recuperación del contaminante en C1-50 fue del  $76.05 \pm 4.70\%$ , con una remoción debida a procesos físico-químicos del  $23.95 \pm 4.70\%$ . (Gráfico 12). En el control abiótico (C2-50) la remoción fue de  $47.43 \pm 2.25\%$  y en los tratamientos (T-50) del  $62.11 \pm 4.50\%$ , es decir un 14.68% más que en C2-50. Se presentan diferencias estadísticas significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre todos los tratamientos con 50 mg/L de Phe. En los tratamientos con 200 mg/L de Phe, la remoción debida a procesos físico-químicos fue del  $16.76 \pm 2.48\%$ , la abiótica del  $40.01 \pm 1.58\%$  y la biótica del  $34.30 \pm 1.13\%$ . Se presentan diferencias estadísticas entre estos tratamientos ( $\alpha=0.05$ ).

Con 50 mg/L de Phe, el sistema presenta una respuesta favorable, mientras que con 200 mg/L no. Debido a que el porcentaje de degradación de T-50 es de apenas un 15 más que el control abiótico (C2-50) se decide trabajar con esta concentración de Phe y ya no realizar el segundo bloque con concentraciones intermedias.

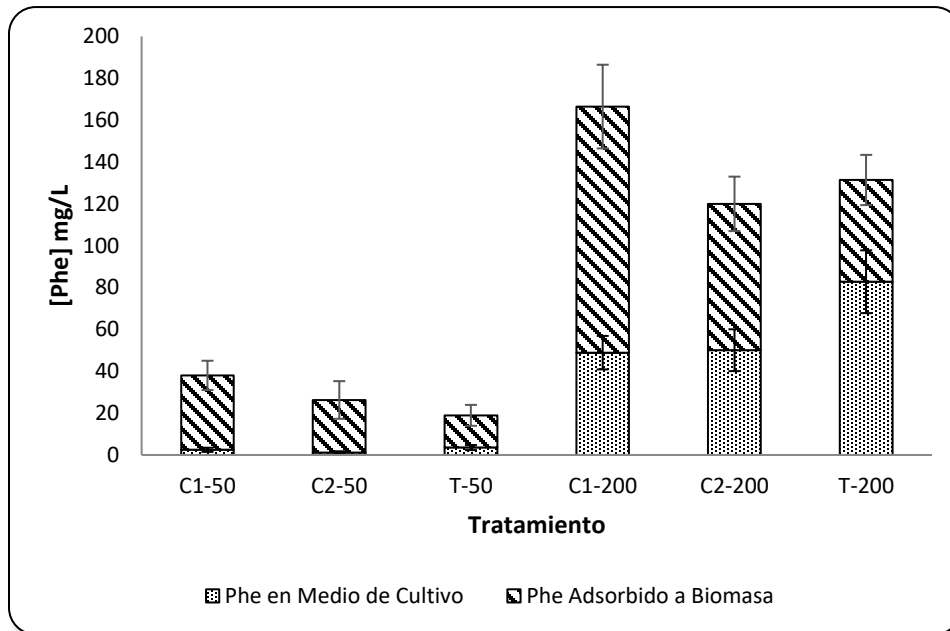


Gráfico 12. Concentración de Fenantreno (Phe) residual en cultivos en suspensión con grano verde de café en agua destilada con 8 días de cultivo.

C1-50: control con medio de cultivo y 50 mg/L de Phe; C2: control con medio de cultivo, biomasa estéril y 50 mg/L de Phe; T: tratamiento con medio de cultivo, biomasa y 50 mg/L de Phe. C1-200: control con medio de cultivo y 200 mg/L de Phe; C2: control con medio de cultivo, biomasa estéril y 200 mg/L de Phe; T: tratamiento con medio de cultivo, biomasa y 200 mg/L de Phe.

### 8.2.7 Crecimiento en placa en medio de cultivo Bushnell-Hass con diesel como fuente de carbono

Con el propósito de mejorar las tasas de remoción de Phe por los microorganismos asociados al grano verde de café, se decide evaluar su capacidad para degradar el contaminante en cultivos axénicos y co-cultivos. Primero se crece a los microorganismos en medio Bushnell-Haas con 1% (v/v) de diesel (BH-D) como única fuente de carbono. Como controles, se emplearon cajas Petri con medio de cultivo Bushnell-Hass con glucosa (BH-G) al 1% (w/v).

Los resultados del crecimiento de las cepas en medio control BH-G se presentan en la [Tabla 14](#). De los siete microorganismos aislados con anterioridad (sección 8.1), únicamente *P. putida*, *F. solani* y *F. oxysporum* mostraron un fuerte crecimiento; mientras que *C. orthosporus*, *R. mucilaginosus* y *A. niger* presentaron bajo crecimiento y *K. variicola*, un crecimiento moderado. Con respecto a la capacidad para crecer en diesel como única fuente de carbono (BH-D), sólo *F. solani* presentó un fuerte crecimiento (32.58 mm  $\pm$ 1.18 y 31.58 mm  $\pm$ 0.85 a las 86 horas en medio BH-D y BH-G, respectivamente). Aunque el crecimiento de *C. orthosporus* fue bajo en medio BH-D, fue

comparable al del control. *F. oxysporum* y *K. variicola* presentaron menor crecimiento que los controles. No hubo crecimiento de *A. niger* y aunque *P. putida* creció ligeramente, éste fue menor que el de *K. variicola*.

Tabla 14. Capacidad de las cepas aisladas de crecer en medio sólido con diesel como única fuente de carbono.

Cepa	BH-G	BH-D
<i>P. putida</i>	+++	-
<i>K. variicola</i>	++	+
<i>C. orthopsilosis</i>	+	+
<i>R. mucilaginosa</i>	+	-
<i>F. solani</i>	+++	+++
<i>F. oxysporum</i>	+++	++
<i>A. niger</i>	+	-

BH-G: medio de cultivo Bushnell-Haas suplementado con 1% (w/v) de glucosa. BH-D: medio de cultivo Bushnell-Haas suplementado con 1% (v/v) de diesel. - = sin crecimiento, + = bajo crecimiento, ++ = crecimiento moderado, +++ = fuerte crecimiento.

Especies como *A. niger*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *P. putida* y *R. mucilaginosa*, además de estar asociados a los cafetos, han sido reportadas como microorganismos capaces de degradar compuestos tóxicos (Bhalerao y Puranik, 2007; Rafin *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2009; Wackett y Gibson, 1988; Kumar *et al.*, 2005; Dai *et al.*, 2010); mientras que varias especies del género *Candida* han sido reportadas como degradadoras de componentes del petróleo (Cerniglia, 1993; Chaillan *et al.*, 2004; Farag y Soliman, 2011) y especies del género *Klebsiella* como degradadoras de colorantes azoicos (Wong y Yuen, 1996; Wong y Yuen, 1998; Elizalde-González *et al.*, 2009). Sin embargo, con base en los resultados de crecimiento en placa con diesel como única fuente de carbono, de las siete cepas aisladas los fusarios son las especies con mayor potencial para degradar hidrocarburos; mientras que *P. putida*, *R. mucilaginosa* y *A. niger* son las menos prometedoras.

Entre las posibles explicaciones del porqué algunos microorganismos aislados durante el enriquecimiento secuencial crecieron poco o no en medio Bushnell-Haas, radica en que el medio Bushnell-Haas es un medio mineral mínimo que, aunque fue suplementado con fuente de carbono fácilmente asimilable en los controles, no satisface todos los requerimientos nutricionales de los diferentes microorganismos. Aún con la adición de 1% (w/v) de glucosa (1 g/L), el crecimiento de las dos levaduras y del hongo filamentoso *A. niger* fue muy bajo. En contraposición, el medio empleado durante el enriquecimiento secuencial, es un medio más rico que contiene elementos traza que pueden actuar como co-factores o inductores de enzima degradativas (Brown *et al.*, 1990; ten Have

y Teunissen, 2001; Levin *et al.*, 2002; Cavallazzi *et al.*, 2005). También contiene 1 g/L de extracto de malta y de polipeptona y aunque esta última se emplea principalmente como fuente de nitrógeno orgánico para el cultivo microbiano, ambos constituyen a su vez una fuente de carbohidratos. Por otra parte, durante el enriquecimiento secuencial las diferentes especies que componen el cultivo mixto pudieron haber actuado de manera conjunta para metabolizar los hidrocarburos presentes en el diesel, de manera que los productos metabólicos de algunos microorganismos pudieron ser empleados como sustrato por otros, facilitando el crecimiento de éstos últimos y disminuyendo con ello la posibilidad de acumular compuestos metabólicos parcialmente oxidados (U.S. Congress OTA, 1991; Canet *et al.*, 2001).

### **8.2.8 Cinéticas de crecimiento en cultivo líquido con hidrocarburos como única fuente de carbono de cultivos axénicos y co-cultivos**

Se evaluó el crecimiento en cultivo líquido únicamente de aquellos microorganismos que mostraron un crecimiento en medio BH-D comparable al control con glucosa (BH-G). Los microorganismos seleccionados fueron los siguientes: *C. orthopsilosis*, *F. oxysporum* y *F. solani*. Los cultivos se incubaron por seis días.

El mayor incremento de la biomasa en peso seco se obtuvo en los dos cultivos inoculados con *F. solani* (3.98 y 4.21% para el monocultivo y el co-cultivo, respectivamente), seguido de los cultivos con *F. oxysporum* (2.18 y 1.82% para el monocultivo y el co-cultivo, respectivamente) (Gráfico 13). La comparación de medias indica que no hay diferencias estadísticas entre el monocultivo con *F. solani* y su co-cultivo, así como tampoco entre el monocultivo con *F. oxysporum* y su respectivo co-cultivo ( $1-\alpha=0.95$ ). El cultivo con menor incremento corresponde a *C. orthopsilosis*.

Cabe destacar que no se adicionó surfactante al medio de cultivo, sin embargo, en los cultivos de *C. orthopsilosis* a partir de las 24 h se observaron pequeñas gotas en la superficie, por lo que es probable que la levadura produzca algún emulsificante al estar en contacto con hidrocarburos del petróleo.

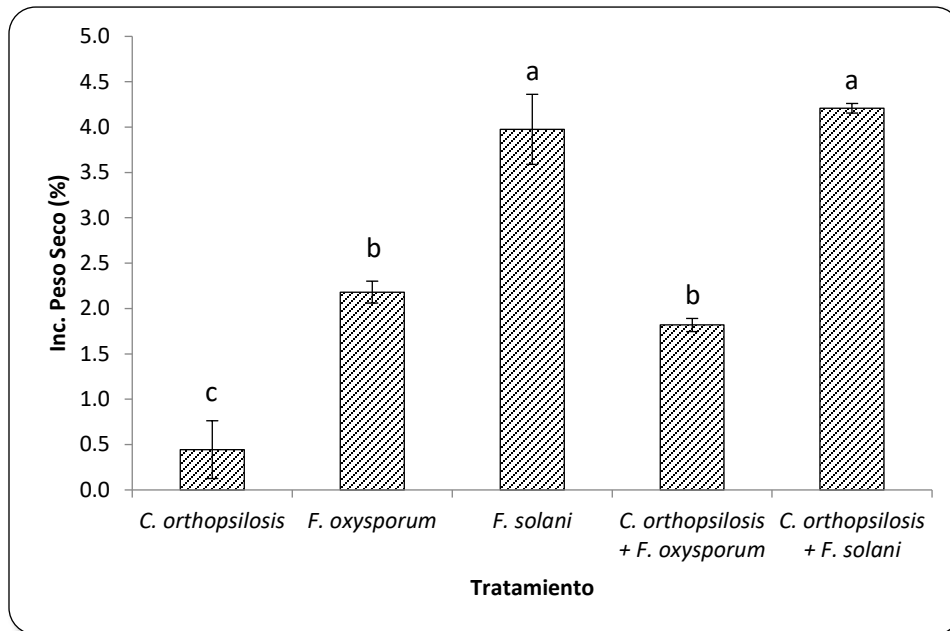


Gráfico 13. Incremento de biomasa en peso seco a los seis días de cultivo. Comparación de medias con LSD. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Se eligió el co-cultivo conformado por la levadura *C. orthopsilosis* y *F. solani* para realizar las pruebas de degradación de Phe, pero primero se comprobó el crecimiento de los microorganismos en cultivo líquido con 50 mg/L de Phe. El [Gráfico 14](#) muestra el incremento en biomasa en peso de la levadura dimórfica *C. orthopsilosis* y el consumo de nutrientes. La mayor producción en biomasa se presenta a las 24 h de incubación, seguido de una fase estacionaria entre las 24 y 72 h de cultivo, con ligeros descensos y ascensos. La comparación de medias indica que no hay diferencias estadísticas significativas ( $1-\alpha=0.95$ ) entre las 24 y 48 h de incubación, ni entre las 60 y 72 h, pero si entre estos dos intervalos de tiempo ( $\alpha=0.05$ ). Se observa una fase de latencia (indicada por el punto de corte en el eje del tiempo de la línea tangente de la curva de crecimiento en su fase exponencial) de aproximadamente 6.8 h.

Con respecto al consumo de nutrientes, se observa un descenso en la concentración del nitrógeno en las primeras 24 h, que coincide con la fase de crecimiento exponencial de la levadura; sin embargo, la comparación de medias indica que no existen diferencias estadísticas significativas ( $1-\alpha=0.95$ ) en este periodo de tiempo. A las 36 h hay un incremento en la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo que se mantiene hasta las 72 h. Tampoco existen diferencias estadísticas significativas entre las 36 las 72 h de cultivo ( $1-\alpha=0.95$ ). La concentración de fósforo en el medio de cultivo tiende a incrementar en el tiempo y aunque existen diferencias estadísticas significativas

( $\alpha=0.05$ ) en el consumo del fósforo, este muestra poca variación a lo largo de todo el periodo de incubación.

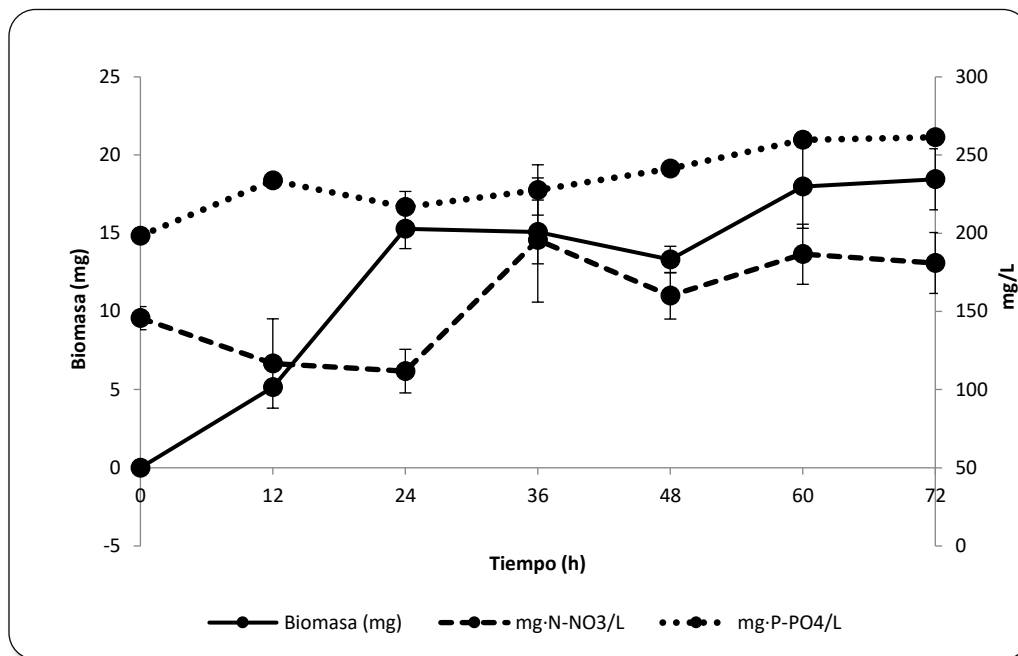


Gráfico 14. Incremento en biomasa de *Candida orthopsilosis* y consumo de nitrógeno y fósforo en cultivos sumergidos con 50 ppm de fenantreno como fuente de carbono.

Teóricamente, para convertir 1 g de hidrocarburo a material celular se consumen aproximadamente 150 mg de N y 30 mg de P (Rosenberg y Ron, 1996). De manera que para convertir 50 mg·Phe/L se requieren al menos 7.5 mg·N/L y 1.5 mg·P/L. El medio de cultivo empleado contiene 1 g/L de NaNO<sub>3</sub> y 0.875 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (lo que equivale a 164.8 mg·N-NO<sub>3</sub>/L y 199.2 mg·P-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>/L, respectivamente), además de fuentes orgánicas de nitrógeno como extracto de levadura y polipeptona, por lo que estos nutrientes se encuentran en cantidades suficientes, de manera que no constituyen un factor limitante. Aunque la relación C:N:P es aproximadamente de 1:3:4, en estudios de biorremediación el nitrógeno y el fósforo se adicionan en cantidades similares (Kim *et al.*, 2010; Sarma y Pakshirajan, 2011; Wilson y Bradley, 1996) y en ocasiones se agregan en exceso sales monobásicas y dibásicas de fosfato para regular el pH del medio de cultivo (Barragán-Huerta *et al.*, 2007; Chulalaksananukul *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2006; Miller y Bartha, 1989; Rafin *et al.*, 2009; Verdin *et al.*, 2004).

Al eliminar la lectura de las 24 h, la curva de crecimiento de *C. orthopsilosis* se ajustó al modelo matemático de Gompertz (Gráfico 15) obteniéndose un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.96924 ( $\alpha=0.05$ ). La tasa máxima de crecimiento ( $\mu_m$ ) se presenta aproximadamente a las 11.7 h siendo de 0.0108 mg/mL/h; mientras que la producción máxima de biomasa en la fase estacionaria

fue de  $0.4909 \pm 0.0463$  mg/mL. Cabe destacar que no se observa fase de latencia al ajuste realizado con este modelo.

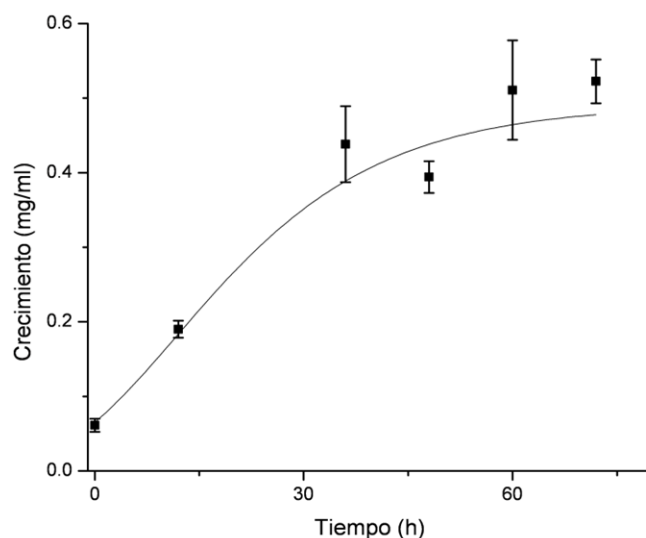


Gráfico 15. Ajuste de los datos de crecimiento de *Candida orthopsilosis* a la ecuación de Gompertz. Cultivos sumergidos con 50 ppm de fenantreno como fuente de carbono.

El hongo filamentoso *F. solani* presenta su máximo crecimiento a las 72 h de cultivo (Gráfico 16), seguido de un descenso en la producción de biomasa, no apreciándose claramente la fase estacionaria debido quizás al pico de las 72 h o bien, a los tiempos de muestreo. No hay diferencias estadísticas significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre las 72 y 120 h, ni entre las 120 a 216 h de cultivo. Sin embargo, es posible que después de las 72 h se haya iniciado la fase de muerte, pero como las hifas fúngicas no lisan tan rápido como las células bacterianas, la biomasa muerta pudo haberse cuantificado como biomasa viva. Cabe destacar que no se observa fase de latencia.

Tanto el nitrógeno como el fósforo presentan un descenso en las primeras 24 h (lo que corresponde con la fase de crecimiento exponencial) que continúa hasta las 72 h. Después de las 72 h, el nitrógeno presente en el medio de cultivo tiende a incrementar conforme disminuye la biomasa. Aunque hay diferencias estadísticas significativas ( $\alpha=0.05$ ) en la concentración de fósforo entre las 216 h con respecto a las 120 y 168, éste se mantiene relativamente constante.



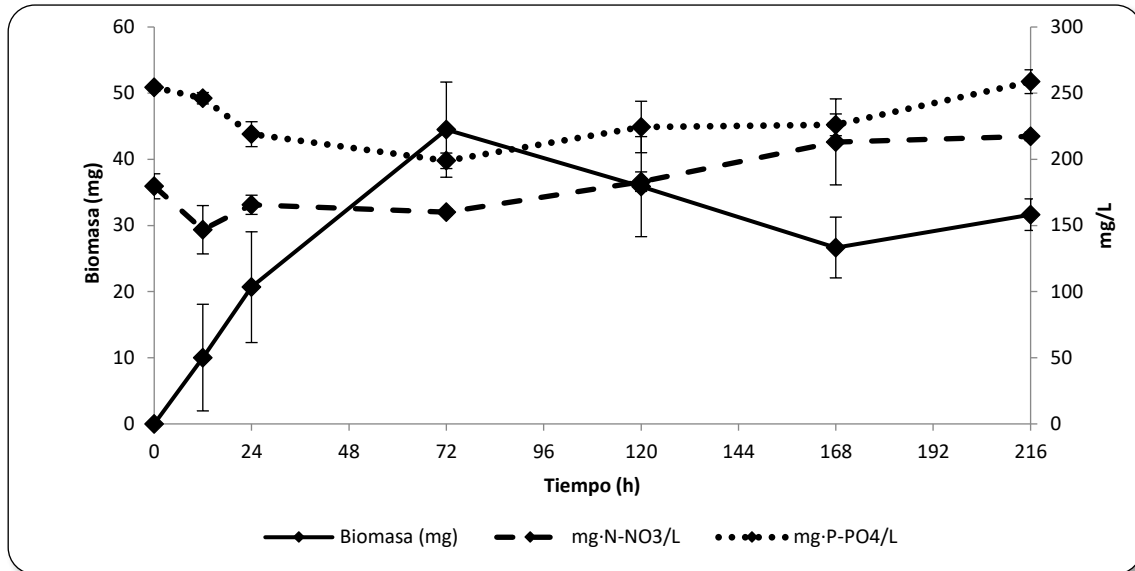


Gráfico 16. Incremento en biomasa de *Fusarium solani* y consumo de nitrógeno y fósforo en cultivos sumergidos con 50 ppm de fenantreno como fuente de carbono.

Con la finalidad de visualizar más claramente las diferentes fases del crecimiento de *F. solani* y determinar si después de las 72 h corresponde a una fase estacionaria o de muerte, se presenta el Ln de la biomasa (Gráfico 17). En este tipo de gráfico, la fase de crecimiento exponencial se presenta como una línea recta entre las 0 y las 12 h de cultivo. Entre las 12 y 24 h hay una desaceleración del crecimiento, seguido de una fase estacionaria.

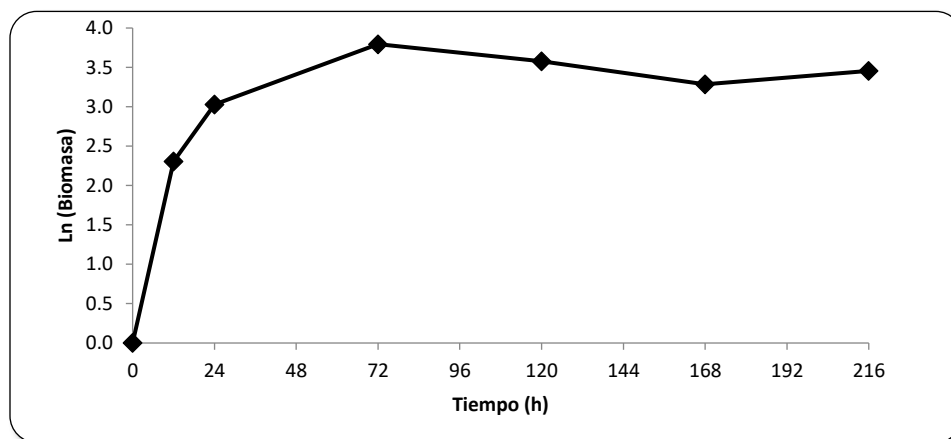


Gráfico 17. Ln de la biomasa generada por *Fusarium solani* en cultivos sumergidos con 50 ppm de fenantreno como fuente de carbono.

De los diferentes modelos matemáticos empleados, al eliminar las dos últimas lecturas, la curva de crecimiento de *F. solani* se ajustó mejor al modelo matemático de Gompertz (Gráfico 18),

obteniéndose un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.9163. La tasa máxima de crecimiento ( $\mu_m$ ) fue de 2.0580 mg/mL/h; mientras que la producción máxima de biomasa en la fase estacionaria fue de  $48.98914 \pm 0.0974$  mg/mL. No se observa fase de latencia al ajuste realizado con este modelo.

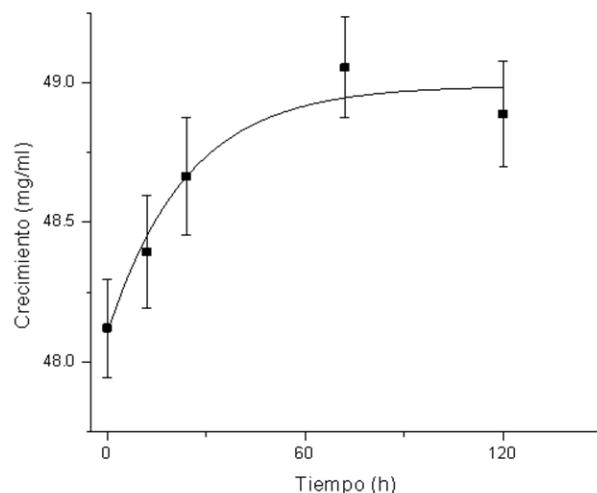


Gráfico 18. Ajuste de los datos de crecimiento de *Fusarium solani* a la ecuación de Gompertz. Cultivos sumergidos con 50 ppm de fenantreno como fuente de carbono.

Tanto *C. orthopsilosis* como el hongo filamentoso *F. solani* son capaces de crecer en cultivos sumergidos con fenantreno como fuente de carbono. Ambos microorganismos muestran un crecimiento acelerado, con fase de latencia corta o sin ella. La fase estacionaria de ambos microorganismos se presenta a partir de las 24 h.

En ambos cultivos, el consumo de nitrógeno se incrementa en las primeras horas de cultivo, lo que coincide con la fase de crecimiento exponencial. Sin embargo no existe una relación inversa entre el consumo de ambos nutrientes y la generación de biomasa. Teóricamente, la relación N:P es adecuada para degradar 50 mg/L de fenantreno.

Con base en los resultados se eligió el co-cultivo conformado por la levadura *C. orthopsilosis* y *F. solani* para realizar las pruebas de degradación de Phe dado que son capaces de crecer en el contaminante y por la tendencia de formar co-agregados, característica importante tanto para la inmovilización por adsorción como para la formación de biopelículas (Rickard *et al.*, 2003).

## 8.3 Tercera etapa: Desarrollo del sistema de inmovilización

### 8.3.1 Exploración de fibras vegetales con uso potencial como soportes de inmovilización

En esta actividad se emplearon dos fibras vegetales con uso potencial como soporte de inmovilización, la fibra de estropajo (*Luffa cylindrica*) y la fibra de coco (*Cocos nucifera*). Debido a que el proceso de extracción de hidrocarburos de aguas consume mucho tiempo, se decidió evaluar visualmente la degradación de petróleo crudo por los microorganismos asociados al grano de café inmovilizados en las fibras. Se trabajó con dos tipos de fibra de *Luffa cylindrica* (denominadas en este documento *Luffa cylindrica 1* y *Luffa cylindrica 2*) y una de coco (Figura 18). La producción del inóculo se efectuó bajo las condiciones de cultivo I8 (nivel intermedio de tamaño de partícula del GVC y nivel alto de humedad) obtenidas con anterioridad y se adicionó de 0.54 a 0.64% de fibra vegetal en peso seco (Tabla 15). Los cultivos se incubaron en 40 mL de medio de los puntos centrales (PC) del diseño de experimentos Plackett-Burman por 24 h a 28°C y 120 rpm. Posteriormente, los soportes con los microorganismos inmovilizados se transfirieron a matraces conteniendo agua destilada, 5% (v/v) de petróleo crudo como única fuente de carbono y 0.5% (v/v) de Tween 80. Los cultivos se incubaron durante 3 semanas a 28°C y 120 rpm.

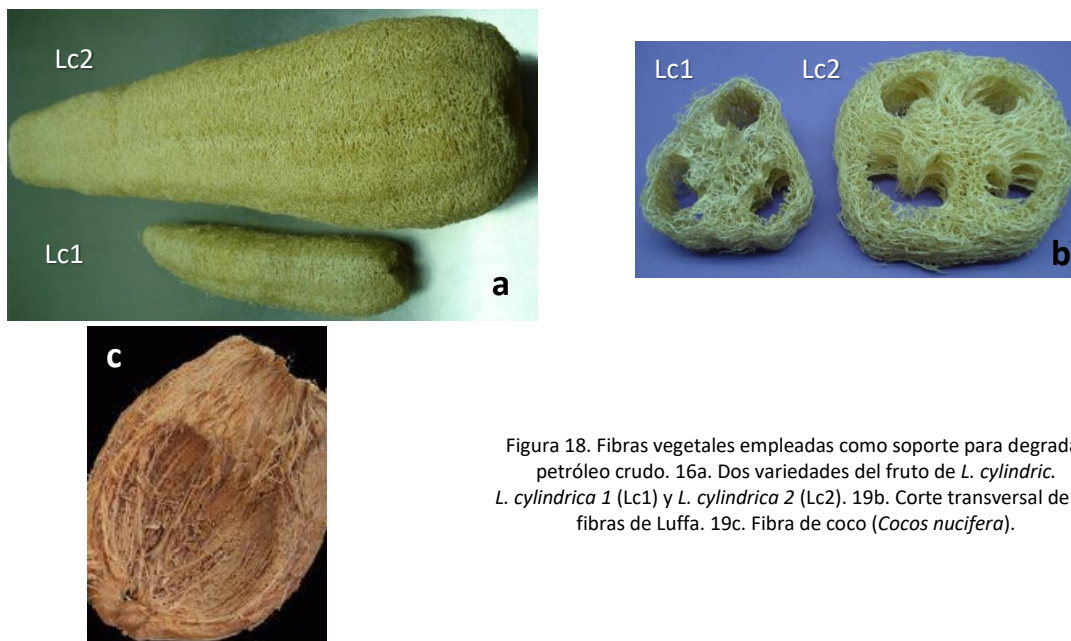


Figura 18. Fibras vegetales empleadas como soporte para degradar petróleo crudo. 16a. Dos variedades del fruto de *L. cylindrica*. *L. cylindrica 1* (Lc1) y *L. cylindrica 2* (Lc2). 19b. Corte transversal de las fibras de Luffa. 19c. Fibra de coco (*Cocos nucifera*).

Tabla 15. Tipo y cantidad de fibra vegetal empleada en los tratamientos exploratorios.

Tratamiento	Tipo de Fibra	Parte de la Fibra Empleada	Peso del Soporte (g)
T1	<i>Luffa cylindrica 1</i>	Externa	0.2151
T2	<i>Luffa cylindrica 1</i>	Interna	0.2155
T3	<i>Luffa cylindrica 2</i>	Externa	0.2556
T4	<i>Luffa cylindrica 2</i>	Interna	0.2556
T5	<i>Cocos nucifera</i>	-	0.2530

A pesar de su mayor peso específico ( $1.01 \pm 0.02 \text{ g/cm}^3$ ) (Saeed e Iqbal, 2013), las fibras de coco permanecieron a flote durante casi todo el periodo de incubación. En contraposición, las fibras de *L. cylindrica 1* se hundieron entre el segundo y tercer día, mientras que las de *L. cylindrica 2*, al día siguiente. Aunque el peso específico de la fibra de lufa es menor que el del agua ( $0.92 \pm 0.05 \text{ g/cm}^3$ ) (Saeed e Iqbal, 2013), la ganancia en peso debido a la adherencia de los microorganismos y partículas de grano de café, así como a la absorción de líquidos, ocasiona que las fibras se hundan en pocos días.

Con respecto a la remoción de petróleo, en los tratamientos con fibra de lufa se observa menor contenido de crudo (Figura 19) y mayor cantidad de partículas de grano de café dentro de los canales (Figura 20). La mayor remoción del crudo en los tratamientos con fibra de lufa podría atribuirse a una elevada eficiencia de transferencia de masas como resultado de su alta porosidad (79 a 93%), de su gran tamaño de poro ( $335 \pm 65 \mu\text{m}$ ) y a la presencia de una intrincada red de canales con una gran área superficial que facilitan la adherencia de microorganismos así como el intercambio de gases y solutos (Saeed e Iqbal, 2013).



Figura 19. Degradación de petróleo crudo por microorganismos asociados al grano de café inmovilizados en fibras vegetales a las 3 semanas de incubación.

T1: parte externa de la fibra de *Lufa cylindrica 1*; T2: parte interna de la fibra de *L. cylindrica 1*; T3: parte externa de la fibra de *L. cylindrica 2*; T4: parte interna de la fibra de *L. cylindrica 2*; T5: fibra de coco (*Cocos nucifera*).

Otro factor que podría favorecer la remoción del crudo es la disponibilidad de nutrientes. Debido a que la capacidad de absorción de líquidos es 10 veces mayor en las fibras de lufa (18.4 g de agua por g de fibra) (Saeed e Iqbal, 2013) que en las de coco (1.8 g de agua por g de fibra) (Bujang *et al.*, 2007), las fibras de lufa podrían absorber mayor volumen del medio de cultivo empleado durante la inmovilización, por lo que habría mayor disponibilidad de nutrientes durante los procesos de degradación. Por otra parte, cuando se agotan los nutrientes del medio de cultivo absorbido a las fibras vegetales se requieren de fuentes alternativas y las partículas de grano de café adheridas a las fibras de lufa podrían suministrar más nutrientes a los microorganismos.

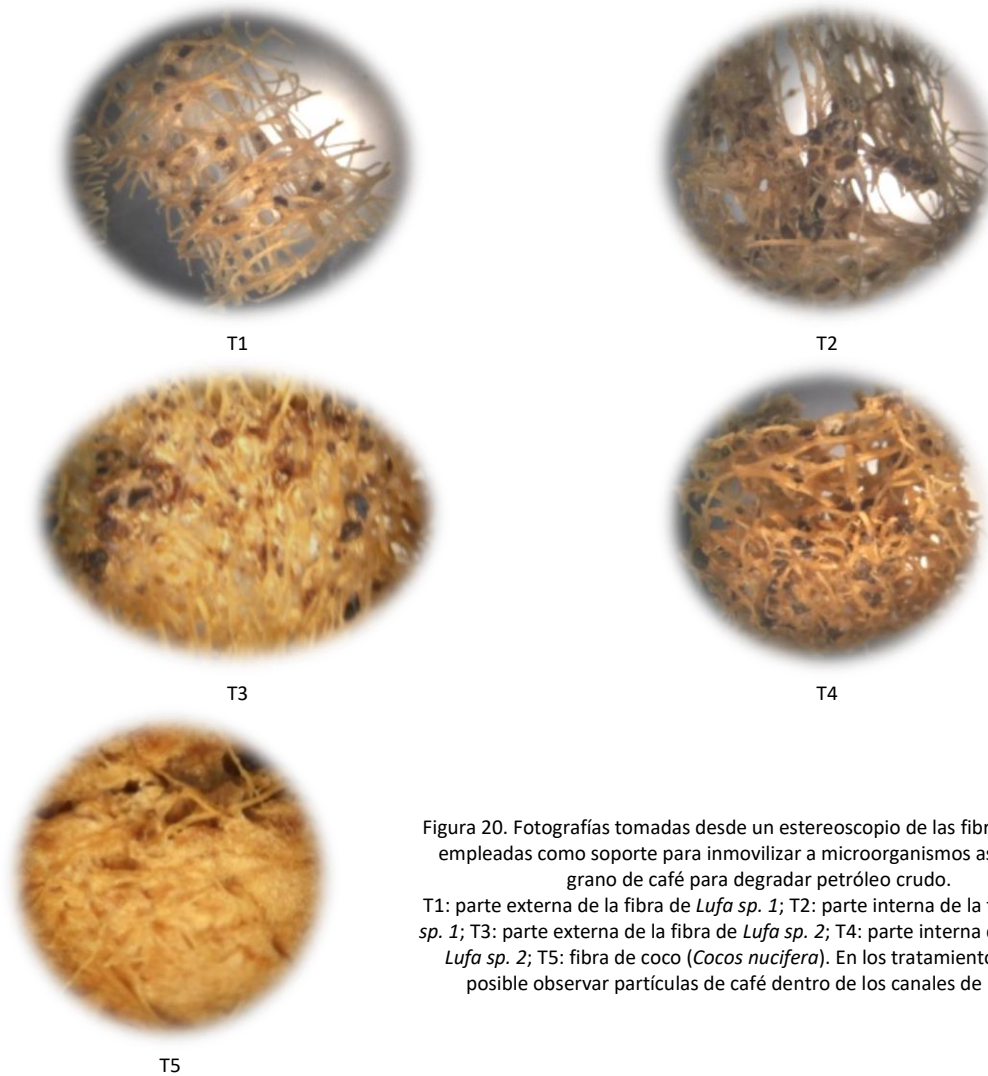


Figura 20. Fotografías tomadas desde un estereoscopio de las fibras vegetales empleadas como soporte para inmovilizar a microorganismos asociados al grano de café para degradar petróleo crudo. T1: parte externa de la fibra de *Luffa sp. 1*; T2: parte interna de la fibra de *Luffa sp. 1*; T3: parte externa de la fibra de *Luffa sp. 2*; T4: parte interna de la fibra de *Luffa sp. 2*; T5: fibra de coco (*Cocos nucifera*). En los tratamientos 1 a 4 es posible observar partículas de café dentro de los canales de la fibra.

Sin embargo, existe la posibilidad de que las fibras de lufa absorban crudo y que la remoción abiótica en estas fibras sea mayor. Pal (2012) evaluó la capacidad de adsorción de diferentes hidrocarburos poliaromáticos (HPA) por residuos agrícolas y encontró que la capacidad de adsorción de los productos de desecho incrementa con el contenido de lignina. De manera que las fibras de lufa podrían estar adsorbiendo petróleo, pero debido a que el contenido de lignina de las fibras de coco es mayor (41 a 45%) (Menon, citado en Satyanarayana *et al.*, 1981) que el de las fibras de lufa (10%) (Saeed e Iqbal, 2013), se esperaría que el primero adsorbiera mayor cantidad de hidrocarburos. Lo anterior concuerda con el trabajo realizado por Annunciado y colaboradores (2005), quienes evaluaron la capacidad de sorción de petróleo de varias fibras vegetales, entre ellas, la fibra de coco y la de lufa. Los resultados de esta investigación muestran que las fibras de coco son más

hidrofóbicas que las de lufa y, cuando el tamaño de las partículas es mayor que 3.35 mm, la capacidad de sorción de las fibras de coco y lufa respectivamente, es de 1.8 y 1.9 g de crudo por gramo de sorbente. Esta capacidad se incrementa cuando el tamaño de las fibras disminuye. Con un tamaño de partícula comprendida entre 0.85 a 1.7 mm, la capacidad de sorción del coco y de la lufa asciende a 5.4 y 4.6 g de crudo por gramo de sorbente, respectivamente. Las piezas de fibras empeladas oscilaron entre los 2 cm, lo que sugiere una capacidad de sorción de hidrocarburos de petróleo similar para ambos tipos de soporte.

### 8.3.2 Diseño factorial 2<sup>3</sup> para evaluar la disponibilidad de nutrientes en el sistema de inmovilización en *Luffa cylindrica*

Se realizó un diseño factorial 2<sup>3</sup> considerando como factores el tiempo de inmovilización, tipo y peso del soporte. Los cultivos se incubaron durante 4 y 9 días a 28°C y 120 rpm en medio de cultivo PC. Los experimentos se realizaron por triplicado. En la [Tabla 16](#) se presentan los factores con los valores correspondientes a los niveles alto y bajo, mientras que en la [Tabla 17](#) se presenta la matriz con los valores codificados.

Tabla 16. Factores considerados en el diseño factorial 2<sup>3</sup> y sus niveles alto y bajo.

Factores	Nivel Bajo	Nivel Alto
Tiempo de inmovilización (d)	1	3
Tipo de soporte	<i>Luffa cylindrica 1</i>	<i>Luffa cylindrica 2</i>
Peso seco del soporte (%)	0.20 - 0.25	0.45 - 0.50

Tabla 17. Matriz de experimentos en orden no estándar del diseño factorial 2<sup>3</sup> con los valores codificados.

Trat.	Tiempo de Inmovilización	Tipo de Soporte	Peso del Soporte
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	-	-	+
5	+	+	-
6	-	+	+
7	+	-	+
8	+	+	+

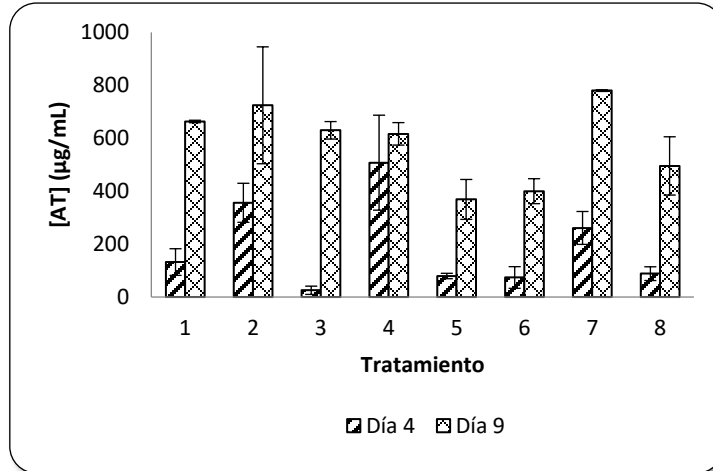
El contenido de azúcares totales (AT) del caldo de cultivo incrementa notablemente del cuarto al noveno día de incubación en todos los tratamientos, lo que sugiere acción directa de los microorganismos sobre los soportes (Gráfico 19a). En términos generales los tratamientos con menor concentración de AT son aquellos con nivel alto en el tipo de soporte (*L. cylindrica 2*). La comparación de medias para el cuarto día de incubación, indica que T4 es significativamente diferente ( $\alpha=0.05$ ) del resto de los tratamientos. Además, no existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos T2 y T7 ( $1-\alpha=0.95$ ), pero si las hay con respecto a los demás tratamientos ( $\alpha=0.05$ ). Estos tres tratamientos tienen nivel bajo en el tipo de soporte (*L. cylindrica 1*).

En relación con el contenido de nitrógeno inorgánico, según se aprecia en el Gráfico 19b, éste tiende a disminuir con el transcurso del tiempo. La comparación de medias indica que no hay diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos para ninguno de los dos días de muestreo y, ninguno de los factores del diseño tiene una influencia significativa en esta variable.

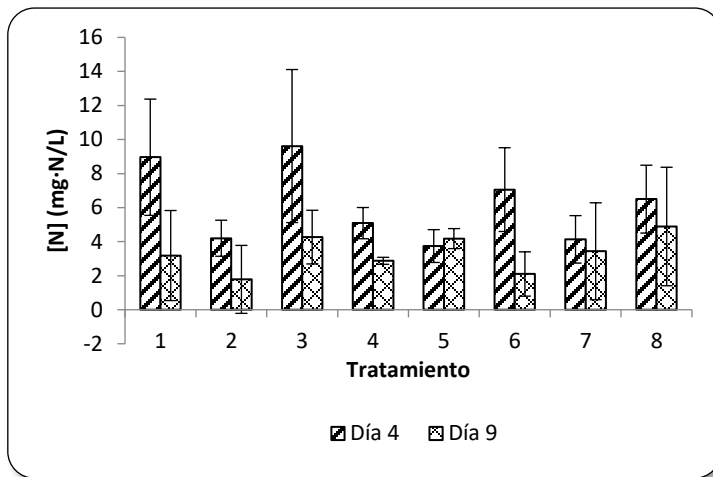
No existe una tendencia clara en cuanto al contenido de fósforo. En los tratamientos 1, 3 y 6 el contenido de fósforo (Gráfico 19c) incrementa en el noveno día de cultivo. Estos tratamientos tienen en común, un nivel alto en el tiempo de inmovilización (3 días). La comparación de medias indica que en el cuarto día de incubación, entre T7 y T2 no existen diferencias ( $1-\alpha=0.95$ ), pero T7 difiere significativamente del resto de los tratamientos ( $\alpha=0.05$ ). Estos tratamientos poseen nivel alto en el tiempo de inmovilización (3 días) y nivel bajo en el tipo de soporte (*L. cylindrica 1*).



a



b



c

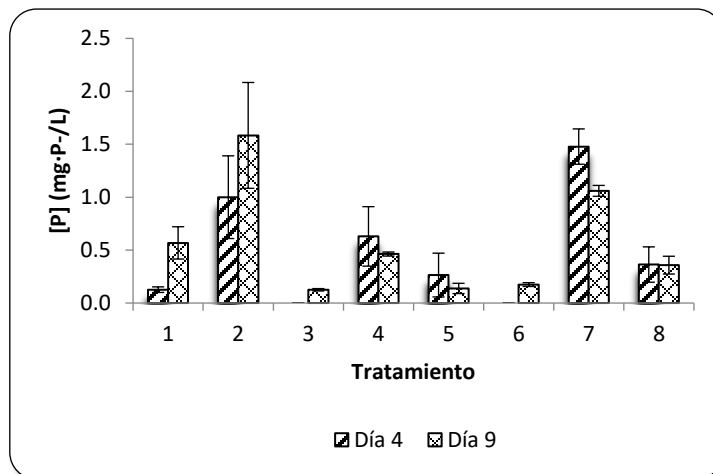


Gráfico 19. Concentración de nutrientes en el caldo de cultivo a los 4 y 9 días de incubación. 19a. Azúcares totales (AT). 19b. Nitrógeno inorgánico. 19c. Fósforo inorgánico.

Cuando se analizan los términos que más influyen en el contenido de AT presentes en el caldo de cultivo se observa que el tipo de soporte es el único factor significativo (Gráfico 20). Si se desea

mayor concentración de AT, se recomienda trabajar con el nivel bajo del tipo de soporte (*L. cylindrica 1*).

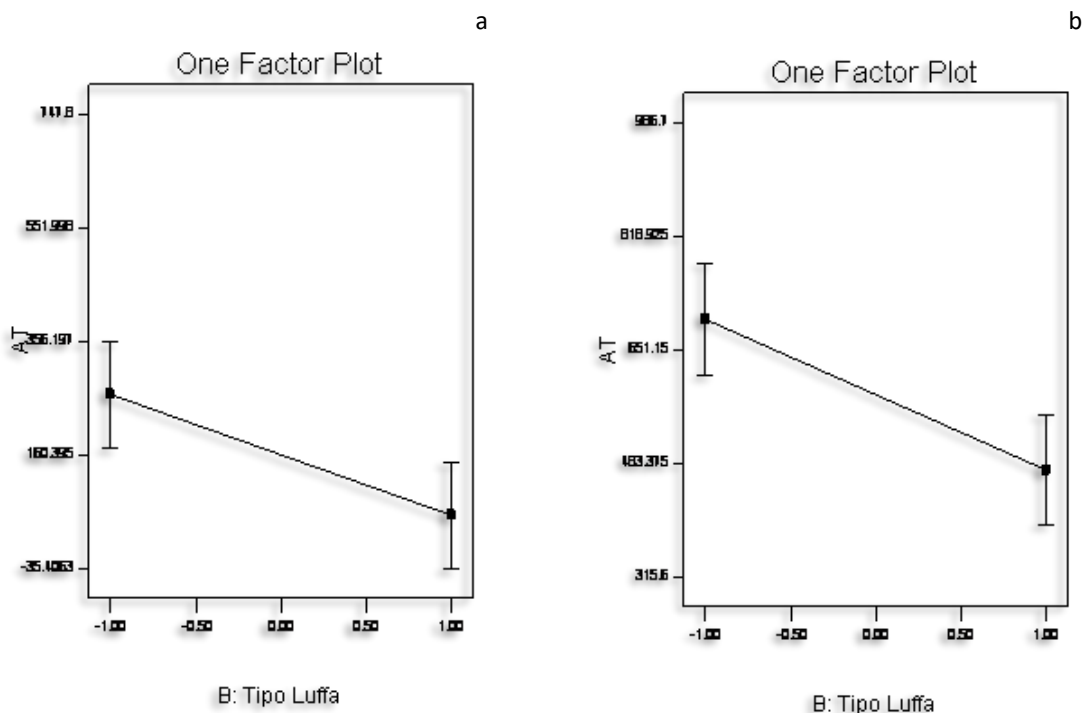


Gráfico 20. Término más significativo del modelo para la variable dependiente azúcares totales (AT) en el cuarto (20a) y noveno (20b) día de cultivo.

Ecuación del cuarto día:  $AT = 190.56 + 5.69 * A - 123.75 * B + 42.23 * C + 11.40 * A * B - 63.75 * A * C - 27.91 * B * C + 53.89 * A * B * C$ .  
 Ecuación del noveno día:  $AT = + 584.87 + 7.36 * A - 111.26 * B - 11.81 * C - 48.74 * A * B + 57.36 * A * C - 14.03 * B * C + 31.81 * A * B * C$ .

En el cuarto día de cultivo, los términos más significativos del modelo en relación con el contenido de fósforo son el tiempo de inmovilización y el tipo de soporte. Según se aprecia en el [Gráfico 21a](#), a niveles altos de tiempo de inmovilización y bajos de tipo de soporte hay mayor disponibilidad de fósforo. En el noveno día de cultivo el único factor significativo es el tipo de soporte y, al igual que en el cuarto día, los niveles altos de fósforo se obtienen con niveles bajos de este factor ([Gráfico 21b](#)).

El hecho de que en los tratamientos con *L. cylindrica 1* como soporte haya mayor contenido de azúcares totales y de fósforo, sugiere que la composición de las fibras difiere. Se ha reportado que las fibras de lufa están compuestas principalmente de celulosa (50 a 60%) y hemicelulosa (25 a 28%), mientras que el contenido de lignina es del 10%. La hemicelulosa contiene azúcares fácilmente asimilables como arabinosa, xilosa, galactosa y glucosa (Saeed e Iqbal, 2013). La variedad 1 de la fibra de lufa podría contener menor cantidad de lignina que la variedad 2, lo que facilitaría el acceso

de los microorganismos a los carbohidratos, pues se ha visto que un mayor contenido de lignina. De manera que el incremento en la concentración de nutrientes podría correlacionarse con un aumento en el número de células bacterianas adheridas (Donlan, 2002). Sin embargo, es necesario corroborarlo con los análisis respectivos.

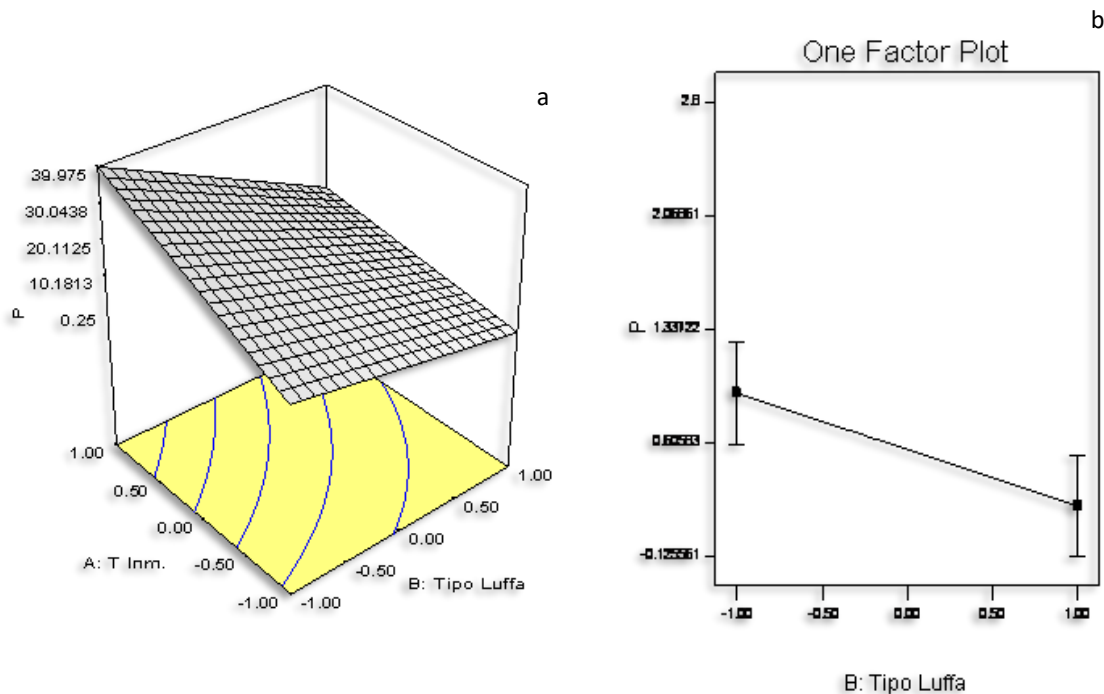


Gráfico 21. Término más significativo del modelo para la variable dependiente fósforo (P) en el cuarto (21a) y noveno (21b) día de cultivo.

$$\text{Ecuación del cuarto día: } P = 15.64 + 9.42 * A - 10.44 * B + 4.42 * C - 4.47 * A * B + 0.24 * A * C - 3.49 * B * C + 0.43 * A * B * C.$$

$$\text{Ecuación del noveno día: } P = + 0.56 + 0.23 * A - 0.36 * B - 0.050 * C - 0.17 * A * B - 0.037 * A * C + 0.13 * B * C.$$

Las altas desviaciones en los resultados de esta actividad obedecen a varios factores. El primero de ellos se debe a la variación en peso de los soportes. Inicialmente se comenzó recortando las fibras vegetales tomando como base las dimensiones (que usualmente oscilan entre 1x1x0.5 cm<sup>3</sup> a 1x1x1 cm<sup>3</sup>), ya que es lo que la mayor parte de la literatura reporta (Iqbal y Edyvean, 2004; Hiden *et al.*, 2007; Phisalaphong *et al.*, 2007; Behera y Ray; 2012; Saeed e Iqbal, 2013). Sin embargo, es muy difícil obtener piezas de dimensiones iguales debido a la morfología de este fruto, por lo que se decidió recortar las piezas con base en el peso. El peso de cada pieza oscila entre 0.08 a 0.1 g. Otro factor que podría influir en el elevado error experimental, reside en el proceso de inmovilización. A matraces de 500 mL de capacidad nominal conteniendo 160 mL de medio de cultivo se adicionaron 16 piezas de soporte. Al ser los cubos de *L. cylindrica. 1* menos densos que los de *L. cylindrica. 2*, ocupan más volumen y, algunos cubos de *L. cylindrica. 1* no quedaron sumergidos apropiadamente

en el medio de cultivo, por lo que la adherencia de partículas de grano de café y microorganismos difiere. Otro factor importante es que al concluir el tiempo de inmovilización, la literatura reporta, que los cubos de lufa deben sumergirse en medio fresco para desorber a los microorganismos que no están bien inmovilizados, muy seguramente los primeros cubos permanecieron más tiempo en el medio fresco y hubo mayor desorción.

### 8.3.3 Espectroscopía en el Infrarrojo Cercano de la fibra de lufa

Con el objeto de evaluar si existen diferencias en la composición de las fibras vegetales empeladas en la inmovilización, éstas se analizaron por espectroscopía en el infrarrojo cercano. El [Gráfico 22](#) muestra los resultados del análisis de espectroscopia en el infrarrojo de 700 a 2400  $\text{cm}^{-1}$ . Según McLellan y colaboradores (1991), la región de los 700  $\text{cm}^{-1}$  es una región de absorción característica de grupos  $\text{CH}_2$  de la lignina; mientras que Huang y colaboradores (2010) indican que otra región de absorción de la lignina se presenta a los 2270  $\text{cm}^{-1}$ . Sin embargo no hay una fuerte absorción en estas longitudes de onda en ninguna de los espectros que indique una diferencia sustancial en el contenido de lignina entre los dos tipos de fibras. Por su parte, Siqueira y colaboradores (2010) mencionan que las bandas entre los 1730 a 1735  $\text{cm}^{-1}$  están relacionadas con diferentes grupos carbonilo y acetilo de la lignina y de la hemicelulosa. Ambos espectros muestran absorción en este rango y con intensidades similares. Lo mismo sucede con la presencia de grupos éteres, ésteres y fenoles de la lignina a 1240  $\text{cm}^{-1}$  (Siqueira *et al.*, 2010). La variedad 1 de la fibra de lufa presenta absorción a 1239  $\text{cm}^{-1}$ , mientras que la variedad 2 a 1244  $\text{cm}^{-1}$ .

Por otra parte, la celulosa absorbe alrededor de los 2252 y 2335  $\text{cm}^{-1}$  (Huang *et al.*, 2010; McLellan *et al.*, 1991). Según Siqueira y colaboradres (2010), las longitudes de onda entre 800 a 1500  $\text{cm}^{-1}$  se relacionan con la celulosa. Algunos tipos de enlace importantes presentes en la celulosa corresponden a 1417  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$ ), 1355  $\text{cm}^{-1}$  (OH), 1162  $\text{cm}^{-1}$  (C-OR-C) y 1055  $\text{cm}^{-1}$  (C-OR) (Tanobe *et al.*, 2005). No se presenta una fuerte absorción a 2252 y 2335  $\text{cm}^{-1}$  en ninguna de las fibras; sin embargo, en ambos casos se presenta absorción a 1423 y 1422  $\text{cm}^{-1}$ , cercano a los enlaces  $\text{CH}_2$  de la celulosa (1417  $\text{cm}^{-1}$ ). Existe también absorción cercana a los enlaces C-OR de la celulosa, representados en los espectros por lecturas a los 1152  $\text{cm}^{-1}$  con intensidad similar en ambos tipos de fibra. No se observa absorción para enlaces C-OR-C. Las mayores diferencias en los espectros se presentan entre los 2060 a 2140  $\text{cm}^{-1}$  aproximadamente. Sin embargo, no fue posible encontrar referencias sobre los grupos químicos asociados a estas longitudes de onda. En términos generales

la intensidad de las bandas correspondientes a los grupos funcionales de la lignina, celulosa y hemicelulosa son muy semejantes indicativo de una composición química similar.

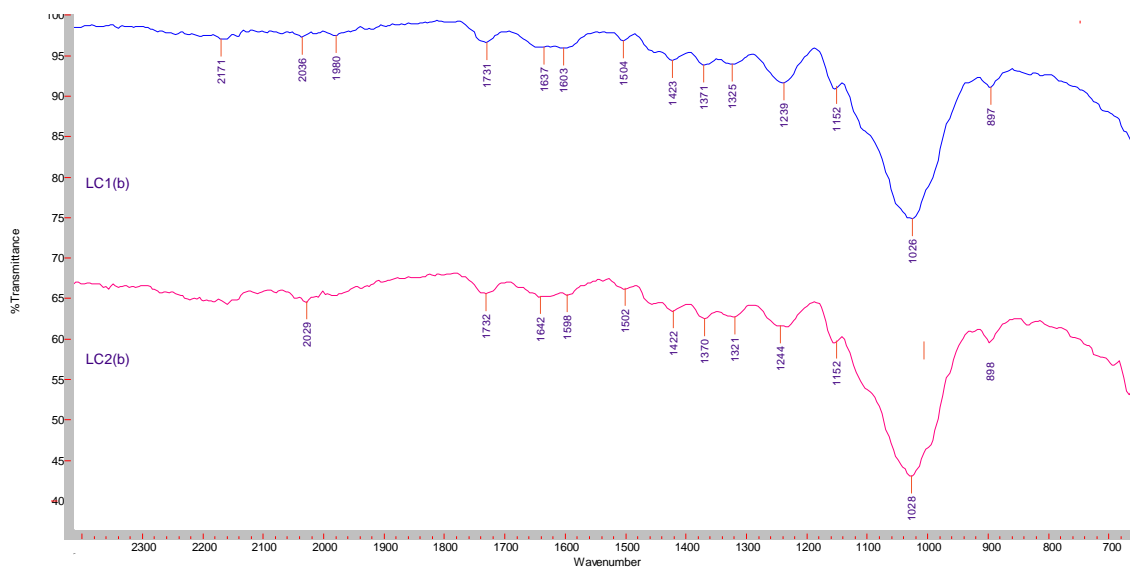


Gráfico 22. Espectroscopías de la fibra de *Luffa cylindrica* por Espectrometría Infrarroja con transformada de Fourier. LC1(b): variedad 1 de *L. cylindrica*, LC2(b): variedad 2 de *L. cylindrica*.

### 8.3.4 Evaluación de las fibras de *Luffa cylindrica* como soportes de inmovilización

En esta ocasión se adicionó menor cantidad de fibra de lufa ( $0.18 \pm 0.003$  g) por unidad experimental con la finalidad de incrementar la cantidad de microorganismos por gramo de soporte, debido a que en experimentos anteriores se observaron zonas de la fibra de lufa sin colonizar; sin embargo los cultivos se incubaron bajo las mismas condiciones anteriormente expuestas.

Las fibras de *L. cylindrica 1* son más delgadas y blandas y el tamaño de poro es mayor, lo que podría incidir en la adherencia y la actividad de los microorganismos. El objetivo de esta actividad consistió en evaluar la adherencia de los microorganismos asociados al GVC a las fibras vegetales en cultivo líquido en agua destilada y agua de mar. Los resultados de este experimento se presentan en el [Gráfico 23](#).

El mayor incremento en peso seco de los soportes se presentó en los cultivos en agua destilada con la variedad 1 de la fibra de lufa usada como soporte de inmovilización (AD-Lc1), seguido de los cultivos en agua de mar con este mismo tipo de fibra (AM-Lc1). Los soportes con menor incremento en peso seco corresponden a los cultivos con la variedad 2 (AD-Lc2 y AM-Lc2).

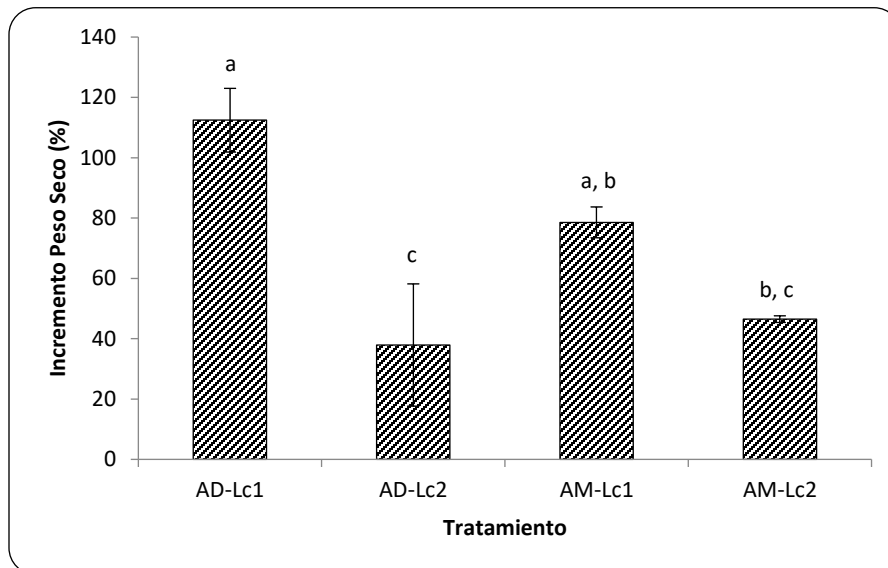


Gráfico 23. Incremento en peso seco de las fibras de *Luffa cylindrica* 1 (Lc1) y *Luffa cylindrica* 2 (Lc2) al término del proceso de inmovilización de 3 días en cultivo líquido en agua destilada (AD) y agua de mar (AM). Comparación de medias con LSD. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

La mayor ganancia en peso de la fibra de *L. cylindrica* 1 podría atribuirse a la mejor eficiencia de transferencia de masa como resultado de su mayor tamaño de poro, lo que facilitaría la adherencia de microorganismos así como el intercambio de gases y solutos (Saeed e Iqbal, 2013). Por otra parte, la adhesión de bacterias a una superficie ocurre más fácilmente en aquellas más ásperas e hidrofóbicas (Donlan, 2002). Las microfografías de la variedad 1 de la fibra (datos no presentados) revelan una superficie menos homogénea y más áspera que en la variedad 2.

No obstante lo anterior, para una misma variedad de *L. cylindrica*, la comparación de medias indica que no existen diferencia estadísticas significativas ( $1-\alpha=0.95$ ) en el incremento en peso de los soportes entre los cultivos en agua destilada y agua de mar, ni entre los dos cultivos en agua de mar con diferentes variedades de fibra de lufa.

En las microscopías de las fibras de lufa se observa la presencia de una biopelícula en todos los tratamientos, siendo más gruesa en la variedad 1. Los microorganismos se localizan preferencialmente en las zonas de la fibra cubiertas por ésta (Figura 21a). En algunos casos, la biopelícula llega a ser tan gruesa que forma grandes colonias sobre la superficie y al interior de las fibras (Figura 21b). Es posible observar una red intrincada de hifas rodeando la biopelícula, aunque también es posible encontrarlas en capas más internas (Figura 21c). Por debajo de las hifas se observan micro-canales tridimensionales por donde podría facilitarse la circulación de gases,

nutrientes y posiblemente de productos de descomposición (d), así como microorganismos creciendo sobre y al interior de estos canales (Figura 21d y Figura 21e).

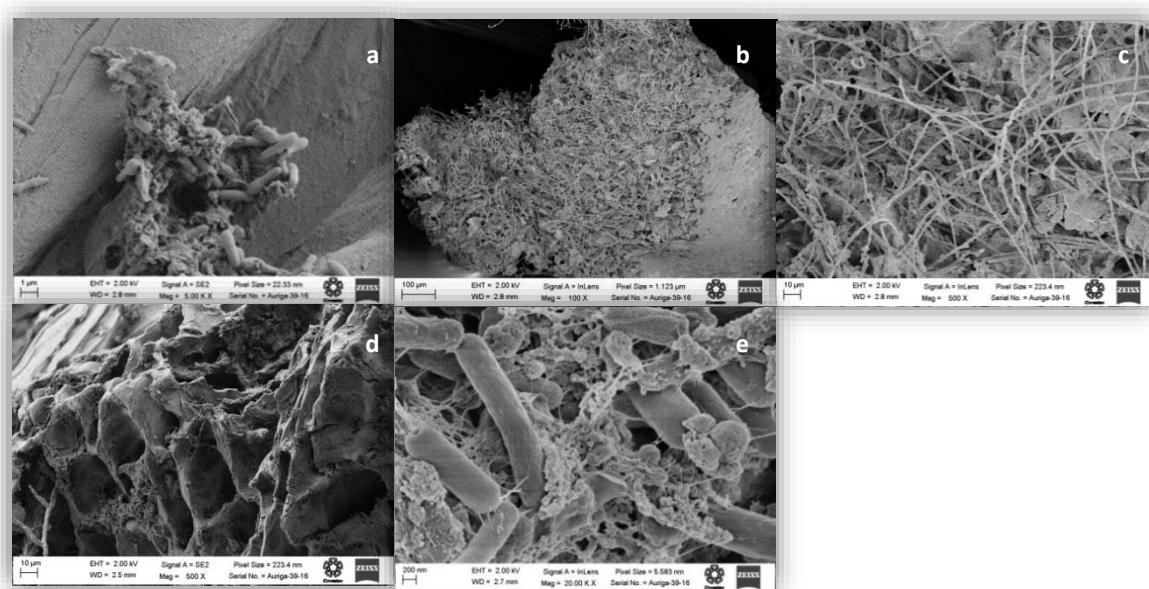


Figura 21. Micrografía electrónica de barrido mostrando la biopelícula de los microorganismos asociados al grano de café crecidos sobre la superficie de la fibra de *Luffa cylindrica* 1 en cultivos en agua de mar a las 72 h de incubación. Biopelícula sobre la superficie de la fibra a 1 µm (22a); 100 µm (22b); 10 µm (22c y 22d); 200 nm (22e). Fotografías tomadas por el Laboratorio Avanzado de Nanoscopia Electrónica del CINVESTAV.

Las células que conforman una biopelícula tienen mayores oportunidades de adaptación y supervivencia, ya que la matriz les proporciona protección frente a fluctuaciones ambientales, especialmente en periodos de estrés (Donlan, 2002; Singh *et al.*, 2006). De manera que los cultivos mixtos que forman biopelículas de manera natural, tienen gran potencial en aplicaciones de biorremediación, ya que se acelera la degradación de compuestos contaminantes debido a las interacciones físicas y fisiológicas de beneficio mutuo entre los diferentes grupos de organismos (Singh *et al.*, 2006).

Según Reid y colaboradores (2006), el incremento en la salinidad induce una mayor producción de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) y de exopolisacáridos (EPS) en los lodos activados. Qurashi y Sabri (2012a y 2012b) investigaron el efecto de las sales en la formación de biopelículas en diversas bacterias y encontraron, que en algunas especies, las sales inducen una mayor formación de biopelículas y acumulación de EPS.

Aunque se sabe que cuando en la inmovilización por adsorción está involucrada la producción de exopolímeros microbianos, la unión de las células está mediada por fuerzas de van der Waals y por

interacciones iónicas o covalentes, a la fecha no existen modelos generales o reglas que expliquen la unión de las células a las superficies (Klein y Ziehr, 1990).

### 8.3.5 Cinéticas de crecimiento de células inmovilizadas en *Luffa cylindrica*

Con base en los resultados anteriores se decidió emplear la fibra vegetal *L. cylindrica 1* para evaluar el grado de adherencia de los microorganismos a la fibra en cultivos en agua destilada y agua de mar. El Gráfico 24 muestra la evolución de la biomasa adherida a la fibra y la presente en el caldo de cultivo. Inicialmente, el grano de café contribuye con la mayor parte de la biomasa asociada al caldo de cultivo; posteriormente, tiende a disminuir, mientras que la biomasa bacteriana adherida a la fibra vegetal tiende a incrementar tanto en cultivos en agua destilada (Gráfico 24a) como en agua de mar (Gráfico 24b). La mayor biomasa inicial en cultivos en agua de mar, tanto en el caldo de cultivo como en la fibra vegetal, se debe a procesos de sorción de sales al papel filtro y al soporte, respectivamente.

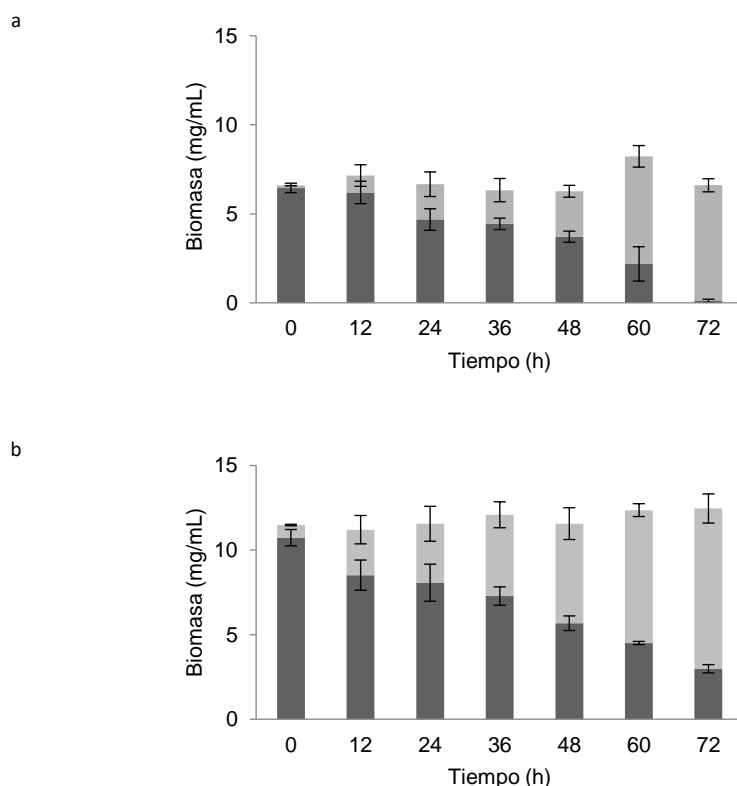


Gráfico 24. Incremento en biomasa en peso seco en cultivo líquido con *L. cylindrica 1* como soporte de inmovilización en agua destilada (24a) y agua de mar (24b).  
 ■ Grano verde de café y células libres presentes en el caldo de cultivo; ■ Microorganismos inmovilizados en la fibra vegetal.



Para contrarrestar el efecto de la sorción de sales, ésta se sustrajo de los datos anteriores, obteniéndose las curvas de crecimiento de los microorganismos inmovilizados en la fibra de lufa. El incremento de la biomasa microbiana fue mayor en los cultivos en agua de mar (Gráfico 25). Los datos de los cultivos de agua destilada se ajustaron a la ecuación sigmoide de Boltzmann ( $R^2=0.94178$ ,  $\mu=0.11834 \text{ h}^{-1}$ ), mientras que los cultivos en agua de mar al modelo exponencial ( $R^2=0.99529$ ,  $\mu=0.16635 \text{ h}^{-1}$ ). En los cultivos en agua destilada, se observa una fase de latencia de 2 días, seguido de un crecimiento exponencial de 12 h (48-60 h) y una fase estacionaria después de 60 h de cultivo. En contraposición, los cultivos en agua de mar presentan un crecimiento gradual (casi lineal) sin fase de latencia ni estacionaria, indicativo de que los microorganismos del GVC toleran las sales y pueden crecer en ambientes salinos.

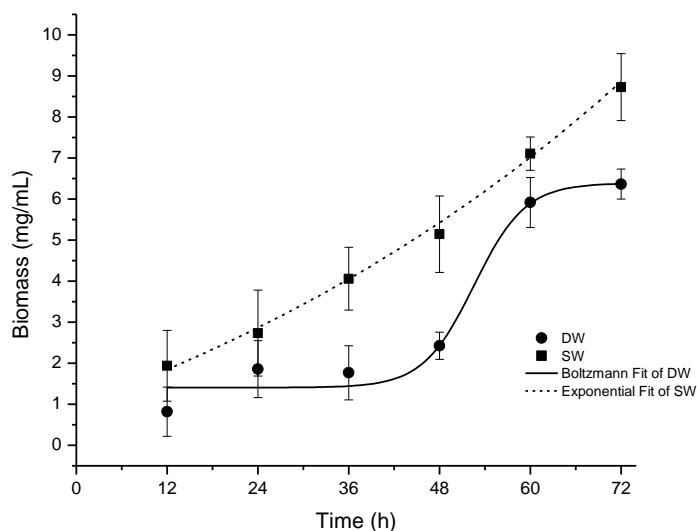


Gráfico 25. Curvas de crecimiento en en peso seco, en cultivo líquido con *L. cylindrica 1* como soporte de inmovilización en agua destilada (DW) y agua de mar (SW).

Un mayor aumento de peso de los soportes y una menor biomasa en el medio de cultivo podrían indicar que el agua de mar favorece el crecimiento de los microorganismos en la fibra vegetal. Para confirmar lo anterior, la biomasa inicial, asociado principalmente al GVC, se sustrajo de la biomasa asociada al caldo de cultivo. Hay un mayor descenso en la biomasa de las células libres en los cultivos en agua de mar, con diferencias estadísticamente significativas a los 12, 36, 48 y 72 h ( $\alpha=0.05$  y  $p=0.0181$ ,  $p=0.0047$ ,  $p=0.0139$  y  $p=0.0168$ , respectivamente) entre ambos cultivos. Es suficiente un periodo de inmovilización de 54 y 48 h para los cultivos en agua destilada y agua de mar, respectivamente.

## 8.4 Cuarta etapa: Ensayos de degradación de fenantreno (50 mg/L)

### 8.4.1 Experimentos de degradación de fenantreno con células libres e inmobilizadas en *Luffa cylindrica* 1 sin fuente primaria de carbono con un periodo de incubación de seis días

Después del primer experimento de degradación de Phe con 200 mg/L descrito en la Sección 8.2.5 con el cultivo mixto del GVC, se realizó un experimento Dosis-Respuesta para evaluar la concentración adecuada de Phe (50 mg/L). También se realizaron experimentos para evaluar el potencial de los microorganismos del GVC aislados para crecer en hidrocarburos como única fuente de carbono (Secciones 8.2.7 y 8.2.8). De esos experimentos se seleccionó a *C. orthopsisilosis* y a *F. solani* para realizar las primeras pruebas de degradación con 50 mg/L de Phe.

Los resultados de estos experimentos a los seis días de incubación con el co-cultivo conformado por *C. orthopsisilosis* y *F. solani* se presentan en el [Gráfico 26](#). Los tratamientos definidos se presentan en la [Tabla 18](#).

Tabla 18. Tratamientos para los experimentos de degradación en agua destilada por el co-cultivo *Candida orthopsisilosis* - *F. solani*, con células libres e inmobilizadas en *Luffa cylindrica* sin glucosa.

Tratamiento	Descripción	Tipo de Cultivo	Biomasa
C1	Control para evaluar la pérdida debido a procesos de foto-oxidación del contaminante	Células libres	
C2	Control para evaluar la remoción abiótica	Células libres	Estéril
CC	Tratamiento biológico	Células libres	Activa
I-C1	Control para evaluar la pérdida debido a procesos de foto-oxidación del contaminante con fibra de <i>L. cylindrica</i> sin colonizar	Células inmobilizadas en <i>L. cylindrica</i>	
I-C2	Control para evaluar la remoción abiótica	Células inmobilizadas en <i>L. cylindrica</i>	Estéril
I-CC	Tratamiento biológico	Células inmobilizadas en <i>L. cylindrica</i>	Activa

Condiciones: UE de 125 mL de capacidad nominal, con 40 mL de medio de cultivo sin glucosa y 50 mg/L de Phe, con un periodo de incubación de 6 días.

En los controles sin biomasa (C1) se recuperó el 92.7% de la concentración inicial (50 ppm), mientras que en los controles con fibra de lufa sin microorganismos (I-C1) el 95.99%. La comparación de medias indica que no existen diferencias estadísticas significativas ( $1-\alpha=0.95$ ) entre estos controles.

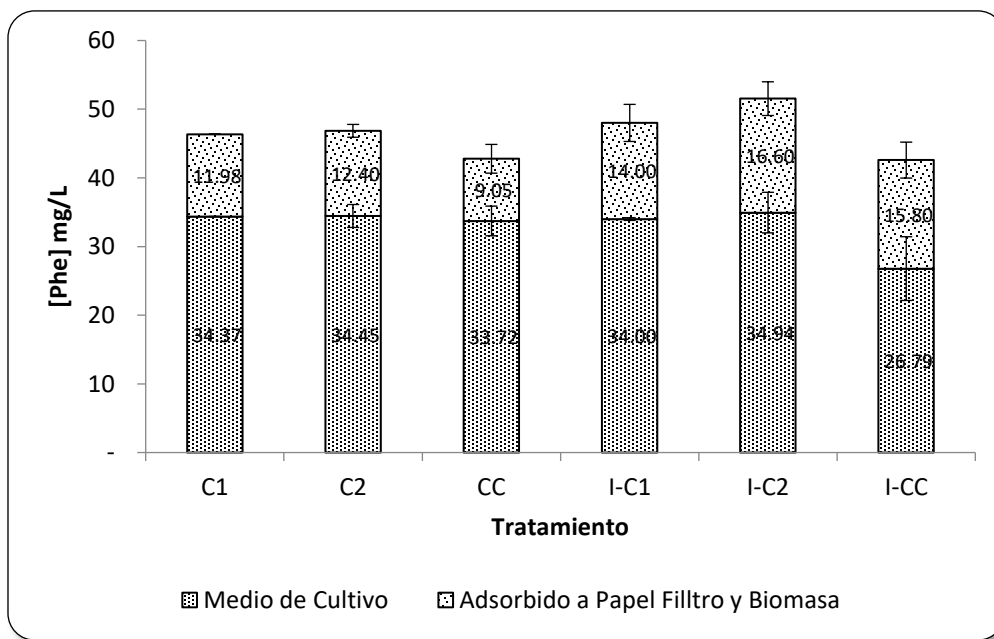


Gráfico 26. Fenantreno (Phe) residual en co-cultivos de *Candida orthopsilosis* y *Fusarium solani* al finalizar el periodo de incubación de 6 días con células libres (C1, C2 y CC) y con células inmovilizadas (I-C1, I-C2 e I-CC). C1: control con medio de cultivo y 50 ppm de Phe; C2: control con medio de cultivo, 50 ppm de Phe y biomasa estéril; CC: tratamiento con medio de cultivo, 50 ppm de Phe y biomasa activa; I-C1: control con medio de cultivo, 50 ppm de Phe y fibra de *Luffa cylindrica* estéril; I-C2: control con medio de cultivo, 50 ppm de Phe y fibra de *L. cylindrica* con biomasa inmovilizada estéril; I-CC: tratamiento con medio de cultivo, 50 ppm de Phe y fibra de *L. cylindrica* con biomasa inmovilizada activa.

En los controles con biomasa inactiva (C2 e I-C2) se recuperó mayor cantidad de Phe que en los controles sin biomasa (C1 e I-C1), sin embargo tampoco existen diferencias estadísticas significativas ( $1-\alpha=0.95$ ) entre estos controles y los anteriores. En el tratamiento con células libres (CC) hubo una remoción del 7.71%, mientras que en el tratamiento con células inmovilizadas (I-CC), el porcentaje de remoción fue del 11.27%. No obstante lo anterior, no existen diferencias estadísticas significativas ( $1-\alpha=0.95$ ) entre estos tratamientos con respecto a los controles sin inocular (C1 e I-C1).

## 8.4.2 Efecto del tiempo de incubación en la degradación de fenantreno en ausencia de fuente de carbono

### 8.4.2.1 Periodo de incubación de nueve días

Debido a los bajos porcentajes de remoción de Phe tanto en cultivos con células libres como con células inmovilizadas, se sugirió ampliar el tiempo de incubación a 9 días y utilizar matraces más grandes para mejorar la aireación, ya que las enzimas degradadoras de hidrocarburos en su mayoría requieren de oxígeno molecular, por lo que en estos experimentos se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL con 40 mL de medio de cultivo, 50 mg/L de Phe y se cubrieron únicamente con tela para cirugía para incrementar aún más el intercambio gaseoso. Los tratamientos se presentan en la [Tabla 19](#).

Tabla 19. Tratamientos para los experimentos de degradación en agua destilada por el co-cultivo *Candida orthopsilosis* - *F. solani*, con células libres sin glucosa.

Tratamiento	Descripción	Tipo de Cultivo	Biomasa
C1	Control para evaluar la pérdida debido a procesos de foto-oxidación del contaminante	Células libres	
C2	Control para evaluar la remoción abiótica	Células libres	Estéril
CC	Tratamiento biológico	Células libres	Activa

Condiciones: UE de 250 mL de capacidad nominal, con 40 mL de medio de cultivo sin glucosa y 50 mg/L de Phe, cubiertos únicamente con tela para cirugía, con un periodo de incubación de 9 días.

Los resultados de degradación a los 9 días de incubación ([Gráfico 27](#)) muestran una eficiencia de recuperación del contaminante del  $65.03 \pm 5.45\%$  en los controles sin biomasa (C1) y del  $71.87 \pm 2.48\%$  en los controles con biomasa estéril (C2). La mayor remoción abiótica de Phe en C2 podría deberse a una mayor inmovilización del contaminante debido a procesos de adsorción en la biomasa muerta, además del Phe no solubilizado y retenido durante el filtrado de las muestras. Se observa una mayor solubilización del Phe en los tratamientos con biomasa activa (CC) y menor remoción abiótica.

La mayor remoción de Phe se obtuvo en los controles sin biomasa (C1), seguido de los co-cultivos (CC). No obstante lo anterior, no se presentan diferencias estadísticas significativas ( $1-\alpha=0.95$ ) entre los tratamientos con biomasa activa con respecto a los controles, tanto para el Phe residual presente en medio de cultivo, como para el removido por procesos abióticos y para el Phe total. De lo anterior

se concluye que ni la aireación ni el mayor tiempo de incubación tuvieron un efecto favorable en la degradación del hidrocarburo.

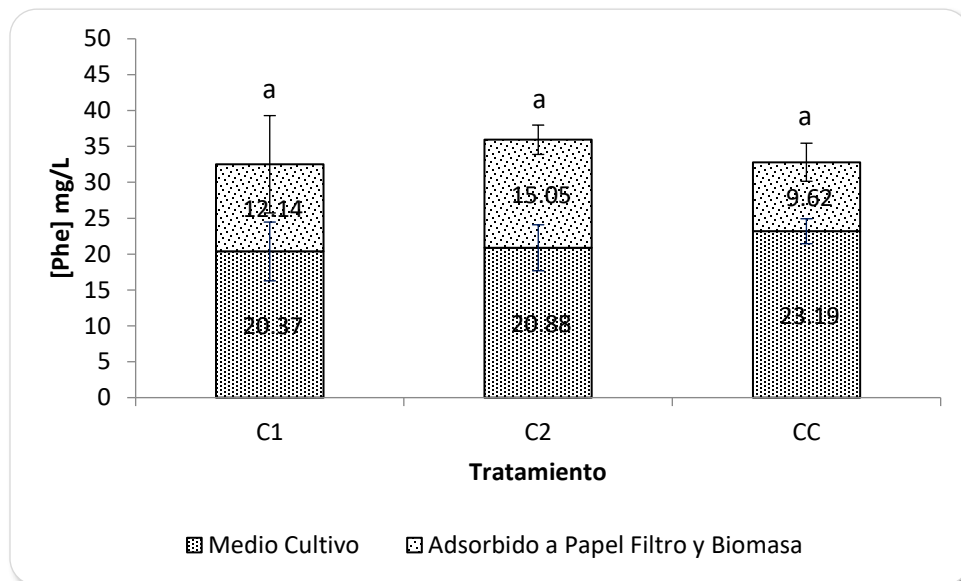


Gráfico 27. Fenantreno (Phe) residual en co-cultivos de *Candida orthopsilosis* y *Fusarium solani* al finalizar el periodo de incubación de 9 días con células libres.

C1: control con medio de cultivo y 50 mg/L de Phe; C2: control con medio de cultivo, 50 mg/L de Phe y biomasa estéril; CC: co-cultivo con medio de cultivo, 50 mg/L de Phe y biomasa activa. Comparación de medias con LSD. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

#### 8.4.2.2 Periodo de incubación de quince días

Debido a que la mayor aireación (dada por el mayor volumen de las UE) no tuvo el efecto deseado, se decidió emplear nuevamente matraces de 125 mL ya que no se contaba con matraces de 250 mL suficientes. Se decidió también ampliar el tiempo de incubación a 15 días y evaluar la capacidad de degradación del cultivo mixto del GVC y de cultivos axénicos de *C. orthopsilosis* y *F. solani* (Tabla 20).

Tabla 20. Tratamientos para los experimentos de degradación en agua destilada con células libres sin glucosa.

Tratamiento	Descripción	Biomasa	Microorganismos
C1-AIT-AD-sG	Control para evaluar la pérdida debido a procesos de foto-oxidación del contaminante, cubierto con tapón de algodón, tela para cirugía y matraz cubierto completamente con papel aluminio.		
C1-T-AD-sG	Control para evaluar la pérdida debido a procesos de foto-oxidación del contaminante, cubierto con tapón de algodón y tela para cirugía.		
C1-AD-sG	Control para evaluar la pérdida debido a procesos de foto-oxidación del contaminante, cubierto con tela para cirugía.		
C2-CO-AD-sG	Control con cultivo axénico para evaluar la remoción abiótica	Estéril	<i>C. orthopsilosis</i>
C2-FS-AD-sG	Control con cultivo axénico para evaluar la remoción abiótica	Estéril	<i>F. solani</i>
C2-CC-AD-sG	Control con co-cultivo para evaluar la remoción abiótica	Estéril	<i>C. orthopsilosis</i> - <i>F. solani</i>
C2-GVC-AD-sG	Control con cultivo mixto para evaluar la remoción abiótica	Estéril	Cultivo mixto del grano verde de café
CO-AD-sG	Tratamiento biológico	Activa	<i>C. orthopsilosis</i>
FS-AD-sG	Tratamiento biológico	Activa	<i>F. solani</i>
CC-AD-sG	Tratamiento biológico	Activa	<i>C. orthopsilosis</i> - <i>F. solani</i>
GVC-AD-sG	Tratamiento biológico	Activa	Cultivo mixto del grano verde de café

Condiciones: UE de 125 mL de capacidad nominal, con 40 mL de medio de cultivo sin glucosa y 50 mg/L de Phe, con un periodo de incubación de 15 días.

Después de 15 días de incubación (Gráfico 28), el porcentaje de recuperación de Phe en el control abiótico con tapón de algodón y papel de aluminio (C1-AIT-AD-sG) fue del  $97.52 \pm 5.98\%$  y en el cubierto únicamente con tapón de algodón (C1-T-AD-sG) fue del  $93.80 \pm 1.81\%$ , sin diferencias

estadísticas significativas ( $1-\alpha=0.95$ ), por lo que las pérdidas debido a procesos de foto-oxidación del contaminante no son significativas. En contraste, el porcentaje de recuperación en el control 1 sin tapón de algodón (C1-AD-sG) fue del  $55.00 \pm 2.95\%$ , con diferencias estadísticas significativas ( $\alpha=0.05$ ,  $p<0.0001$ ) entre este control y los anteriores. El mayor intercambio de gases de las unidades experimentales sin tapón de algodón favorece la evaporación del contaminante (Burwood y Speers, 1974; Lehr, 2001). Al finalizar el periodo de incubación de 15 días, el volumen del medio de cultivo se reduce aproximadamente en un 50%. La pérdida debida a procesos de evaporación del contaminante fue superior al 38%.

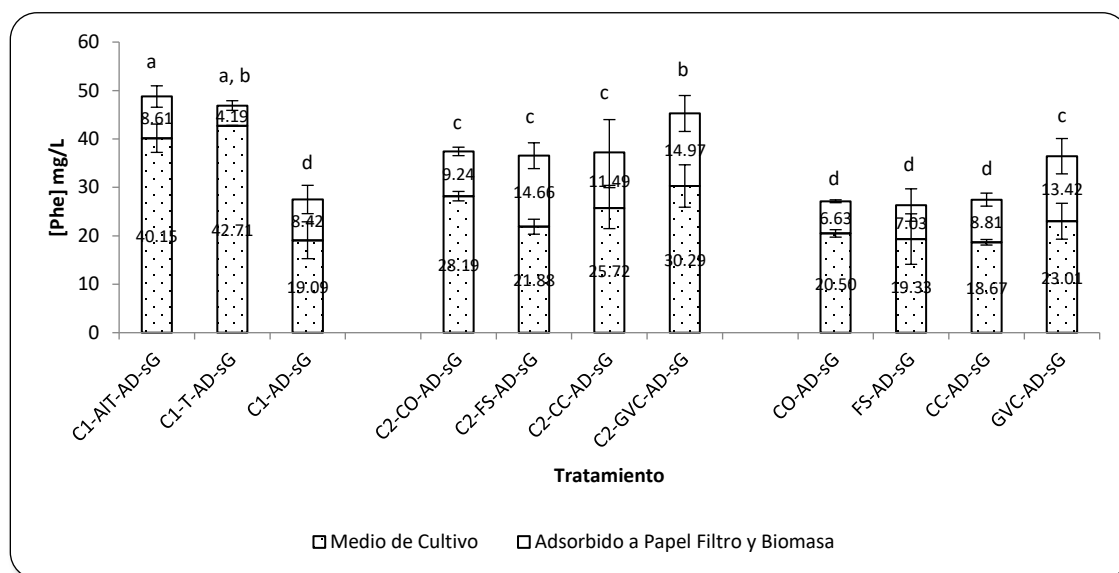


Gráfico 28. Fenantreno (Phe) residual en cultivos axénicos y mixtos al finalizar el periodo de incubación de 15 días con células libres en cultivo líquido sin fuente primaria de carbono en agua destilada. Comparación de medias con LSD. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

El porcentaje de remoción de Phe en los tratamientos inoculados con el hongo filamentoso *F. solani* (FS-AD-sG) fue del  $47.29 \pm 4.29\%$ , mientras que los inoculados con la levadura *C. orthopsilosis* (CO-AD-sG) del  $45.74 \pm 0.98\%$ , el de los co-cultivos (CC-AD-sG) del  $45.04 \pm 3.73\%$  y el del cultivo mixto (GVC-AD-sG) del  $27.12 \pm 0.13\%$ , con diferencias estadísticas significativas entre este último tratamiento y los demás ( $\alpha=0.05$ ,  $p<0.0001$ ). La comparación de medias indica que no hay diferencias estadísticas significativas ( $1-\alpha=0.95$ ) entre los tratamientos con biomasa activa ni entre el control abiótico sin tapón de algodón (C1-AD-sG,  $45.00 \pm 2.95\%$ ).

Con respecto a los controles con biomasa inactiva, únicamente el tratamiento con los microorganismos del grano verde de café (C2-GVC-AD-sG) difiere estadísticamente de los demás, siendo mayor la concentración de Phe residual en este control en un  $16.40 \pm 0.92\%$ . En lo que

respecta a la adsorción del contaminante a la biomasa, los cultivos de *F. solani* (C2-FS-AD-sG) y del cultivo mixto (C2-GVC-AD-sG) presentaron una mayor adsorción del contaminante a la biomasa y al papel filtro, seguido de los co-cultivos (C2-CC-AD-sG) y por último de los inoculados con la levadura *C. orthopsilosis* (C2-CO-AD-sG).

Los resultados de los experimentos anteriores sugieren que bajo las condiciones de cultivo empleadas, si bien los microorganismos evaluados son capaces de utilizar el Phe como fuente de carbono, sus mecanismos enzimáticos no están tan especializados como los de otros para metabolizar altas concentraciones del contaminante. Por ejemplo, Wiesel y colaboradores (1993) emplearon un cultivo mixto para degradar mezclas de hidrocarburos poliaromáticos (33 mg/L de dibenzofurano, 40 mg/L de dibenzotiofeno, 11 mg/L de fluoreno, 175 mg/L de Phe, 10 mg/L de antraceno, 60 mg/L de fluoranteno y 50 mg/L de pireno) con células libres e inmovilizadas en arcilla granular. Para los experimentos de degradación realizados en matraces Erlenmeyer de 100 mL, los autores reportan porcentajes de degradación de Phe y antraceno del 77 y 61%, respectivamente, después de 6.5 días de incubación con células libres. Las células inmovilizadas mostraron un crecimiento estable así como un potencial de degradación equivalente al de las células en suspensión.

### **8.4.3 Efecto de la adición de glucosa como fuente primaria de carbono en la degradación de fenantreno**

#### ***8.4.3.1 Cultivos en agua destilada con células libres***

Con base en los resultados anteriores se decidió agregar 6 g/L de glucosa como fuente primaria de carbono para favorecer la degradación cometabólica del Phe. Las condiciones de cultivo fueron las mismas que en el experimento anterior (Sección 8.4.2.2), los tratamientos fueron los siguientes:



Tabla 21. Tratamientos para los experimentos de degradación en agua destilada con células libres con glucosa.

Tratamiento	Descripción	Biomasa	Microorganismos
C1-AIT-AD-cG	Control para evaluar la pérdida debido a procesos de foto-oxidación del contaminante, cubierto con tapón de algodón, tela para cirugía y matraz cubierto completamente con papel aluminio.		
C1-T-AD-cG	Control para evaluar la pérdida debido a procesos de foto-oxidación del contaminante, cubierto con tapón de algodón y tela para cirugía.		
C1-AD-cG	Control para evaluar la pérdida debido a procesos de foto-oxidación del contaminante, cubierto con tela para cirugía.		
C2-CO-AD-cG	Control con cultivo axénico para evaluar la remoción abiótica	Estéril	<i>C. orthopsilosis</i>
C2-FS-AD-cG	Control con cultivo axénico para evaluar la remoción abiótica	Estéril	<i>F. solani</i>
C2-CC-AD-cG	Control con co-cultivo para evaluar la remoción abiótica	Estéril	<i>C. orthopsilosis-F. solani</i>
C2-GVC-AD-cG	Control con cultivo mixto para evaluar la remoción abiótica	Estéril	Cultivo mixto del grano verde de café
CO-AD-cG	Tratamiento biológico	Activa	<i>C. orthopsilosis</i>
FS-AD-cG	Tratamiento biológico	Activa	<i>F. solani</i>
CC-AD-cG	Tratamiento biológico	Activa	<i>C. orthopsilosis-F. solani</i>
GVC-AD-cG	Tratamiento biológico	Activa	Cultivo mixto del grano verde de café

Condiciones: UE de 125 mL de capacidad nominal, con 40 mL de medio de cultivo con 6 g/L de glucosa y 50 mg/L de Phe, con un periodo de incubación de 15 días.

En términos generales, el Phe residual disminuyó en los cultivos con glucosa como fuente primaria de carbono (Gráfico 29). El porcentaje de recuperación del contaminante en los controles abióticos C1-AIT-AD-cG, C1-T-AD-cG y C1-AD-cG fue del  $85.85 \pm 5.31\%$ ,  $82.07 \pm 1.70\%$  y  $32.47 \pm 2.10\%$ , respectivamente. Lo anterior implica una disminución en la recuperación entre el 11.68 al 11.73% en los controles con tapón de algodón y del 22.54% en el control sin tapón con respecto a los

controles abióticos sin glucosa (C1-AIT-AD-sG, C1-T-AD-sG y C1-AD-sG, Sección 8.4.3). No se presentan diferencias estadísticas significativas ( $1-\alpha=0.95$ ) entre los controles abióticos con tapón de algodón (C1-AIT-AD-cG y C1-T-AD-cG), pero sí entre éstos y el control si tapón (C1-AD-cG,  $\alpha=0.05$ ,  $p<0.0001$ ), de manera que los procesos físicos tienen mayor efecto sobre el contaminante que los químicos como la foto-oxidación.

La mayor remoción de Phe en los tratamientos biológicos con glucosa se presentó en los cultivos inoculados con el cultivo mixto del grano verde de café (GVC-AD-cG,  $83.29 \pm 2.31\%$ ), seguido del tratamiento con *F. solani* (FS-AD-cG,  $77.81 \pm 3.43\%$ ), con diferencias estadísticas significativas ( $\alpha=0.05$ ,  $p<0.0001$ ) entre estos tratamientos biológicos ( $\alpha=0.05$ ,  $p<0.0001$ ) y el control abiótico (C1-AD-cG). Lo anterior sugiere que la adición de glucosa favoreció la remoción cometabólica del contaminante en estos tratamientos.

No se presentan diferencias estadísticas significativas ( $1-\alpha=0.95$ ) en la concentración total de Phe residual en los controles con biomasa estéril. Los tratamientos que generan mayor biomasa (C2-FS-AD-cG y C2-GVC-AD-cG) presentan mayor remoción abiótica y menor concentración de Phe en medio de cultivo.

El Phe residual disminuyó en los cultivos con glucosa en relación con los que no tienen fuente primaria de carbono. En términos generales la diferencia porcentual entre los controles con biomasa estéril es menor al 10%, con excepción de los tratamientos C2-GVC-AD-sG y C2-GVC-AD-cG que es del 11.5%. Es posible que las variaciones en la temperatura ambiental, por la época del año, influyeran en los procesos de evaporación. Los tratamientos biológicos con glucosa presentan picos adicionales con tiempos de retención menores a los del contaminante de interés, lo que sugiere la presencia de metabolitos parcialmente oxidados debido a la transformación biológica del contaminante.

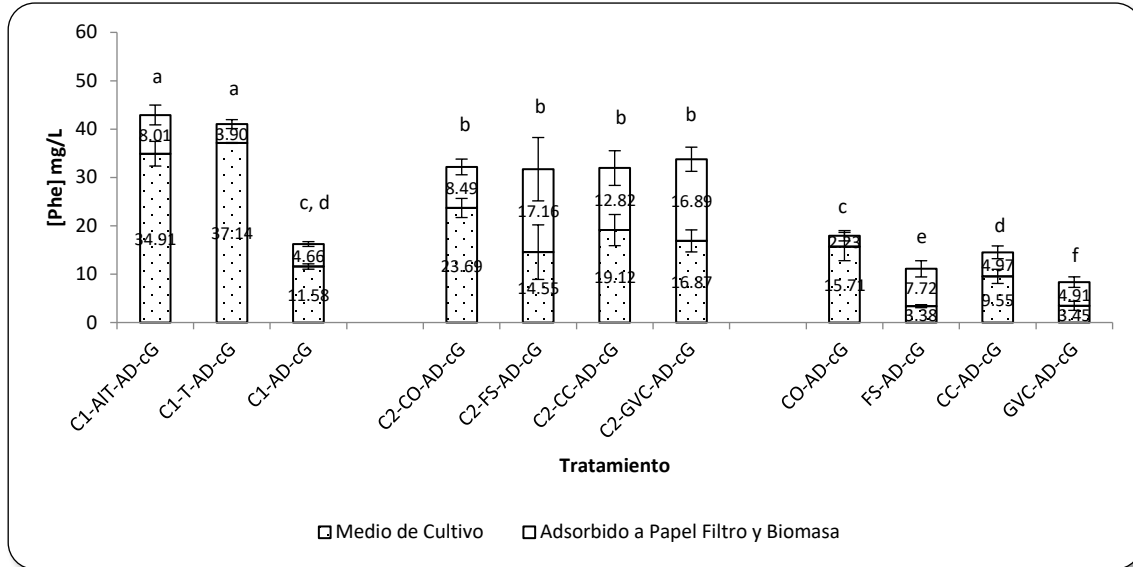


Gráfico 29. Fenantreno (Phe) residual en cultivos axénicos y mixtos al finalizar el periodo de incubación de 15 días con células libres en agua destilada con 6 g/L de glucosa como fuente primaria de carbono.

C1: control abiótico para evaluar la pérdida debido a procesos de foto-oxidación del contaminante; C2: control con biomasa estéril para evaluar la remoción abiótica; T: UE cubierta con tapón de algodón y tela para cirugía; Al: UE cubierta completamente con papel aluminio; AD: cultivos en agua destilada; AM: cultivos en agua de mar; CO: cultivos inoculados con *C. orthopsilosis*; FS: cultivos inoculados con *F. solani*; GVC: cultivos inoculados con el cultivo mixto del grano verde de café.

Comparación de medias con LSD. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

#### 8.4.3.2 Cultivos en agua destilada con células inmovilizadas

Con respecto a los experimentos de degradación de Phe con cultivos en agua destilada y células inmovilizadas se definieron los mismos tratamientos que en la sección anterior (Tabla 22). En el Gráfico 30 se presenta el Phe residual presente tanto en medio de cultivo como el adsorbido a biomasa y al papel filtro. En el control abiótico con tapón de algodón y papel aluminio (I-C1-AIT-AD-cG) se recuperó el  $67.14 \pm 1.80\%$  del contaminante, mientras que en el control con tapón de algodón (I-C1-T-AD-cG) se recuperó el  $57.18 \pm 3.72\%$  y en el control con tela para cirugía (I-C1-AD-cG) se recuperó el  $47.43 \pm 6.09\%$ . Las pérdidas del contaminante debido a procesos físico-químicos son cercanas al 20%. Se presentan diferencias estadísticas significativas entre éstos tres controles ( $\alpha=0.05$ ,  $p<0.0001$ ).

Tabla 22. Tratamientos para los experimentos de degradación en agua destilada con células inmovilizadas con glucosa.

Tratamiento	Descripción	Biomasa	Microorganismos
I-C1-AIT-AD-cG	Control para evaluar la pérdida debido a procesos de foto-oxidación del contaminante, con fibra de <i>L. cylindrica</i> sin colonizar, cubierto con tapón de algodón, tela para cirugía y matraz cubierto completamente con papel aluminio		
I-C1-T-AD-cG	Control para evaluar la pérdida debido a procesos de foto-oxidación del contaminante, con fibra de <i>L. cylindrica</i> sin colonizar, con cubierto con tapón de algodón y tela para cirugía		
I-C1-AD-cG	Control para evaluar la pérdida debido a procesos de foto-oxidación del contaminante, con fibra de <i>L. cylindrica</i> sin colonizar, cubierto con tela para cirugía		
I-C2-CO-AD-cG	Control con cultivo axénico para evaluar la remoción abiótica con biomasa inactiva inmovilizada en fibra de de <i>L. cylindrica</i>	Estéril	<i>C. orthopsilosis</i>
I-C2-FS-AD-cG	Control con cultivo axénico para evaluar la remoción abiótica con biomasa inactiva inmovilizada en fibra de de <i>L. cylindrica</i>	Estéril	<i>F. solani</i>
I-C2-CC-AD-cG	Control con co-cultivo para evaluar la remoción abiótica con biomasa inactiva inmovilizada en fibra de de <i>L. cylindrica</i>	Estéril	<i>C. orthopsilosis-F. solani</i>
I-C2-GVC-AD-cG	Control con cultivo mixto para evaluar la remoción abiótica con biomasa inactiva inmovilizada en fibra de de <i>L. cylindrica</i>	Estéril	Cultivo mixto del grano verde de café
I-CO-AD-cG	Tratamiento biológico con biomasa inmovilizada en fibra de de <i>L. cylindrica</i>	Activa	<i>C. orthopsilosis</i>
I-FS-AD-cG	Tratamiento biológico con biomasa inmovilizada en fibra de de <i>L. cylindrica</i>	Activa	<i>F. solani</i>
I-CC-AD-cG	Tratamiento biológico con biomasa inmovilizada en fibra de de <i>L. cylindrica</i>	Activa	<i>C. orthopsilosis-F. solani</i>
I-GVC-AD-cG	Tratamiento biológico con biomasa inmovilizada en fibra de de <i>L. cylindrica</i>	Activa	Cultivo mixto del grano verde de café

Condiciones: UE de 125 mL de capacidad nominal, con 40 mL de medio de cultivo con 6 g/L de glucosa y 50 mg/L de Phe, con un periodo de incubación de 15 días.

La concentración de Phe residual en los tratamientos biológicos es comparable con la de los controles abióticos, y aunque existen diferencias estadísticas significativas entre algunos tratamientos biológicos, la concentración de Phe residual total en ninguno de ellos es significativamente menor ( $1-\alpha=0.95$ ) a la del control abiótico (I-C1-AD-cG). De manera que la inmovilización de los microorganismos no favoreció la remoción del contaminante.

No se presentan diferencias significativas ( $1-\alpha=0.95$ ) en la concentración de Phe residual total en los controles con biomasa inactiva, pero sí en lo adsorbido a biomasa y papel filtro ( $\alpha=0.05$ ,  $p<0.0001$ ). Los tratamientos con mayor remoción abiótica corresponden a los inoculados con *F. solani* y con los microorganismos asociados al grano verde de café (I-FS-AD-cG e I-GVC-AD-cG, respectivamente) que son los que generan mayor biomasa.

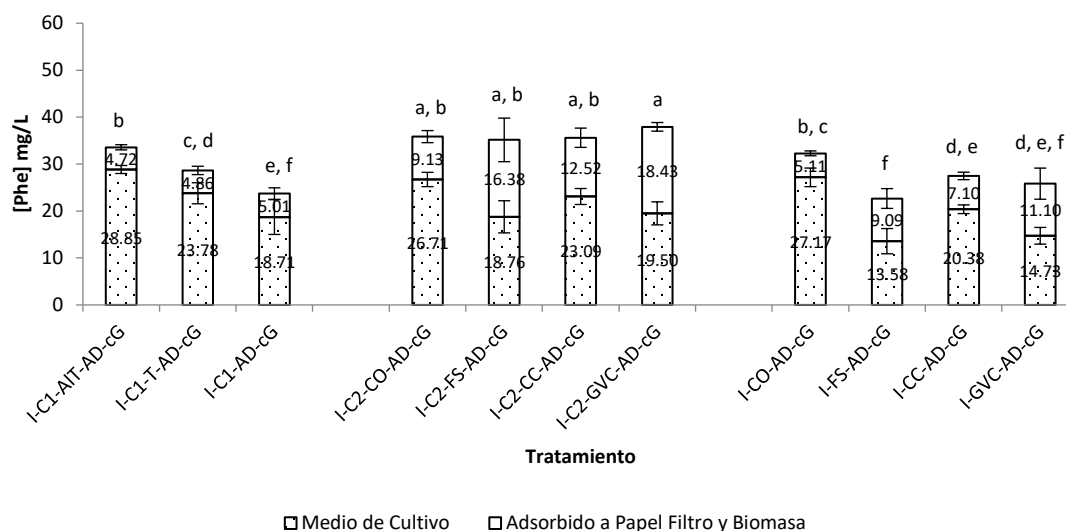


Gráfico 30. Fenantreno (Phe) residual en cultivos axénicos y mixtos al finalizar el periodo de incubación de 15 días con células inmovilizadas en fibra de *Luffa cylindrica* Roem en agua destilada con 6 g/L de glucosa como fuente primaria de carbono. I: cultivos con células inmovilizadas; C1: control abiótico para evaluar la pérdida debido a procesos de foto-oxidación del contaminante; C2: control con biomasa estéril para evaluar la remoción abiótica; T: UE cubierta con tapón de algodón y tela para cirugía; Al: UE cubierta completamente con papel aluminio; AD: cultivos en agua destilada; AM: cultivos en agua de mar; CO: cultivos inoculados con *C. orthopsis*; FS: cultivos inoculados con *F. solani*; GVC: cultivos inoculados con el cultivo mixto del grano verde de café. Comparación de medias con LSD. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

En términos generales se recuperó más Phe en los controles abióticos de los cultivos en suspensión (C1-AIT-AD-cG y C1-T-AD-cG, Sección 8.4.4) que en los cultivos inmovilizados (I-C1-AIT-AD-cG y I-C1-T-AD-cG), pero el porcentaje de recuperación de los controles abióticos de los cultivos inmovilizados fue mayor que su contraparte con células en suspensión. La degradación biológica del Phe fue mayor en los cultivos con células libres.

### 8.4.3.3 Cultivos en agua de mar con células libres e inmovilizadas

Para los experimentos en agua de mar, se decidió agregar glucosa como fuente primaria de carbono. Debido a que en los experimentos con células libre en agua destilada (Sección 8.4.4) la mayor remoción del contaminante se obtuvo con el cultivo del grano verde de café y, en los experimentos con células inmovilizadas (Sección 8.4.5) no hubo diferencias estadísticas significativas ( $1-\alpha=0.95$ ) entre el cultivo axénico de *F. solani* y el cultivo de GVC, se decidió trabajar con éste último únicamente. Se definieron seis tratamientos, tres con células en suspensión y tres con células inmovilizadas (Tabla 23).

Tabla 23. Tratamientos para los experimentos de degradación en agua de mar con células libres e inmovilizadas en *Luffa cylindrica* con glucosa.

Tratamiento	Descripción	Tipo de Cultivo	Biomasa
C1-AM-cG	Control para evaluar la pérdida debido a procesos de foto-oxidación del contaminante	Células libres	
C2-GVC-AM-cG	Control para evaluar la remoción abiótica	Células libres	Estéril
GVC-AM-cG	Tratamiento biológico	Células libres	Activa
I-C1-AM-cG	Control para evaluar la pérdida debido a procesos de foto-oxidación del contaminante con fibra de <i>L. cylindrica</i> sin colonizar	Células inmovilizadas en <i>L. cylindrica</i>	
I-C2-GVC-AM-cG	Control para evaluar la remoción abiótica	Células inmovilizadas en <i>L. cylindrica</i>	Estéril
I-GVC-AM-cG	Tratamiento biológico	Células inmovilizadas en <i>L. cylindrica</i>	Activa

Condiciones: UE de 125 mL de capacidad nominal, con 40 mL de medio de cultivo sin glucosa y 50 mg/L de Phe, con un periodo de incubación de 15 días.

En los cultivos con células en suspensión (Gráfico 31) se presentan diferencias estadísticas significativas ( $\alpha=0.05$ ,  $p=0.0366$ ) en la remoción de Phe entre el control abiótico (C1-AM-cG) y el tratamiento biológico (GVC-AM-cG), siendo mayor un 9.95% en este último. La eficiencia de recuperación del contaminante en el control con biomasa inactiva (C2-GVC-AM-cG) fue elevada ( $91.86 \pm 11.76\%$ ). Los tratamientos con células inmovilizadas mostraron un comportamiento similar. Existen diferencias estadísticas significativas ( $\alpha=0.05$ ,  $p=0.0018$ ) entre el control abiótico con células

inmovilizadas (I-C1-AM-cG) y el tratamiento biológico (I-GVC-AM-cG), siendo un 17.06% mayor en este último. La eficiencia de recuperación del contaminante en el control con biomasa inactiva (I-C2-GVC-AM-cG) fue del  $79.28 \pm 9.54\%$ .

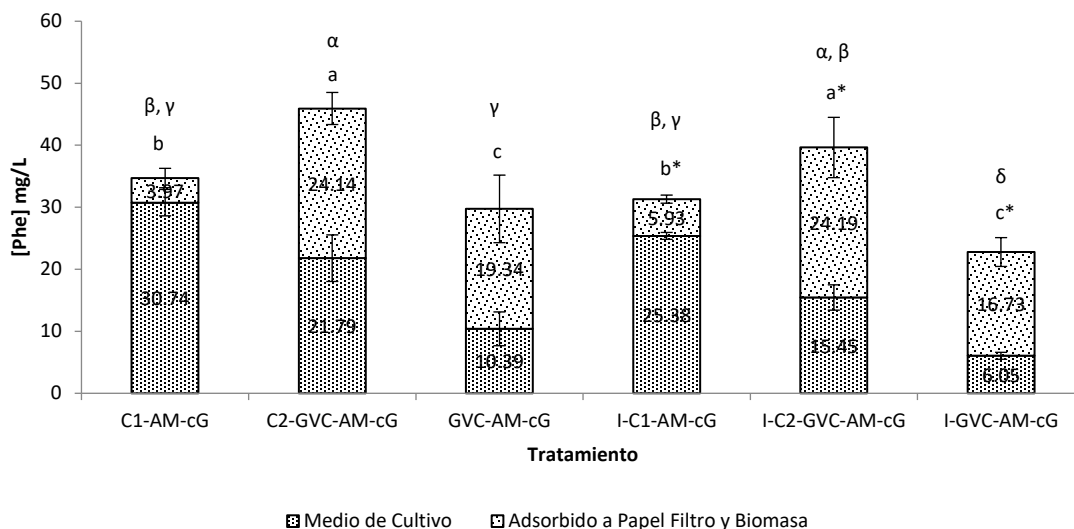


Gráfico 31. Fenantreno (Phe) residual en cultivos axénicos y mixtos al finalizar el periodo de incubación de 15 días con células libres e inmovilizadas en fibra de *Luffa cylindrica* en agua de mar con 6 g/L de glucosa como fuente primaria de carbono. Comparación de medias con LSD. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

El porcentaje de recuperación de Phe en los controles abióticos C1-AM-cG y I-C1-AM-cG fue del  $69.43 \pm 3.40\%$  y  $62.63 \pm 2.10\%$ , respectivamente, sin diferencias estadísticas significativas ( $1-\alpha=0.95$ ). La eficiencia de extracción del contaminante en los controles con biomasa inactiva fue un 12.58% mayor en los cultivos con células libres; sin embargo la comparación de medias indica que no existen diferencias estadísticas significativas ( $1-\alpha=0.95$ ). Se presentan diferencias estadísticas significativas ( $\alpha=0.05$ ,  $p=0.0010$ ) en la remoción de Phe entre los tratamientos biológicos en agua mar, siendo un 7.11% mayor en los cultivos con células inmovilizadas en la fibra de lufa (I-GVC-AM-cG). Lo anterior sugiere que la inmovilización de los microorganismos asociados al grano verde de café en la fibra vegetal favorece la degradación del contaminante en cultivos en agua de mar.

La adición de glucosa al medio de cultivo favoreció la degradación del contaminante en cultivos en agua destilada con células libres y en agua de mar, tanto en cultivos con células en suspensión como inmovilizadas en la fibra de lufa. En los cultivos en agua destilada con células libres se mejoró la remoción del Phe fue un 10 y 15% en los cultivos inoculados con el hongo filamentoso *F. solani* y con el cultivo mixto del grano verde de café (GVC), respectivamente; mientras que en los cultivos

en agua de mar, la mejora en la remoción fue del 9.95% y del 17.06% en los tratamientos con células libres e inmovilizadas, respectivamente.

Si bien la adición de una fuente al medio de cultivo mejora la degradación cometabólica del hidrocarburo, la evaporación es el factor físico más importante en la remoción del contaminante en cultivos líquidos. Valores mayores a  $1.0 \times 10^{-6}$  mm Hg en la presión de vapor y una constante de Henry ( $H_c$ ) mayor a  $1 \times 10^{-3}$  atm·m<sup>3</sup>/mol indican un potencial de evaporación alto. El fenantreno posee una presión de vapor de  $6.8 \times 10^{-4}$  mm Hg y una  $H_c$  de  $5.4041 \times 10^{-3}$  atm·m<sup>3</sup>/mol lo que refuerza los resultados obtenidos (Mackay y Shiu, 1981; Wick *et al.*, 2011).

No obstante lo anterior, con base en experimentos realizados previamente, en donde se utilizó diesel como única fuente de carbono tanto para aislar a los microorganismos del grano de café como para crecerlos en cultivo sólido antes del proceso de inoculación en cultivo líquido, es posible que los microorganismos degraden mezclas de hidrocarburos como la gasolina, diesel y otros combustibles con hidrocarburos alifáticos saturados e insaturados de cadena corta.



## 9. CONCLUSIONES

---

### 9.1 Primera etapa

Se aislaron un total de siete microorganismos tolerantes a diesel, 3 hongos filamentosos (*Aspergillus niger*, *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum*), 2 levaduras (*Candida orthopsilosis* y *Rhodotorula mucilaginosa*) y dos bacterias (*Pseudomonas putida* y *Klebsiella variicola*).

### 9.2 Segunda etapa

La mejores condiciones para producir el inóculo del grano verde de café se obtuvieron con un nivel intermedio (0.42 a 0.86 mm) de tamaño de partícula y nivel alto de humedad (40% de la CRA).

El agua de mar inhibió la actividad de la enzima galactosa oxidasa y el estrés generado por el agua de mar en los microorganismos ocasiona una mayor actividad específica de la enzima glucosa oxidasa. No fue posible determinar si el fenantreno tiene algún efecto en la actividad de la enzima glucosa oxidasa.

En cuanto al efecto de los nutrientes y del emulsificante, únicamente las fuentes inorgánicas de nitrógeno y fósforo tuvieron un efecto significactivo en la degradación de fenantreno a los 9 días de cultivo.

La relación C(100):N(10) no favoreció la actividad metabólica del cultivo mixto del grano verde de café para degradar 200 mg/L de fenantreno tanto en cultivos en agua destilada como en agua de mar. La remoción del contaminante se debe principalmente a procesos de sorción.

El sistema biológico presentó una respuesta favorable en el experimento Dosis-Respuesta con una concentración de 50 mg/L de fenantreno, mientras que con 200 mg/L no.

De los microorganismos aislados con anterioridad, únicamente *F. solani* y *C. orthopsilosis* fueron capaces de crecer en placa en un medio mineral mínimo (Bushnell-Haas) con diesel como única fuente de carbono y en cultivo líquido con fenantreno como fuente de carbono. Ambos microorganismos muestran un crecimiento acelerado, con fase de latencia corta o sin ella.

### 9.3 Tercera etapa

La variedad 1 de la fibra de estropajo *Luffa cylindrica* promovió una mayor adherencia de microorganismos que la variedad 2, tanto en cultivos en agua destilada como en cultivos en agua de mar. Aunque hay más disponibilidad de azúcares totales y de fósforo en el caldo de cultivo con la variedad 1 de la fibra a los 4 y 9 días, los análisis por espectroscopía en el infrarrojo cercano indican que no hay diferencias en la composición química entre estas dos fibras vegetales; por lo que es posible que el mayor tamaño de poro sea el factor que más incide en la adherencia de los microorganismos al soporte.

Los microorganismos del grano verde de café fueron capaces de crecer en agua de mar y de formar biopelículas. El agua de mar promueve una mayor adherencia de los microorganismos al soporte que el agua destilada.

### 9.4 Cuarta etapa

Del conjunto de experimentos realizados tanto con el cultivo mixto, como con cultivos axénicos y co-cultivos, se tiene lo siguiente:

La aireación y el tiempo de incubación no tuvieron efecto en la remoción de fenantreno por los microorganismos del grano verde de café, ya sea como cultivo mixto, cultivo axénico o co-cultivo.

La adición de glucosa favoreció la remoción cometabólica del contaminante en cultivos con células libres en agua destilada inoculados con *F. solani* y con el cultivo mixto del grano verde de café, pero no tuvo un efecto favorable en cultivos con células inmobilizadas. La inmobilización de los microorganismos no favoreció la actividad catalítica, siendo mayor la degradación biológica del fenantreno en los cultivos con células libres.

En los cultivos en agua de mar con glucosa, hubo mayor remoción biológica tanto en los cultivos con células en suspensión como en los cultivos con células inmobilizadas. La inmobilización de las células en agua de mar favoreció la remoción del contaminante un 7% más con respecto a los cultivos con células en suspensión.

## 9.5 Conclusiones generales y perspectivas

Aunque algunos de los microorganismos aislados del grano verde de café pueden crecer en medio de cultivo con diesel como única fuente de carbono, sus mecanismos enzimáticos no están tan especializados para metabolizar altas concentraciones de fenantreno. Aunque en este trabajo no se evaluó la habilidad de éstos para competir con la microflora presente en ambientes acuáticos con derrames ocasionales de petróleo como el Golfo de México, no se recomienda emplearlos en estudios de bioaumentación. Una alternativa sería inmovilizar a la microflora presente en aguas contaminadas con hidrocarburos del petróleo en el grano de café o en la fibra de lufa, o bien en otro soporte, y evaluar su efecto en la degradación de éstos.

Las propiedades de la fibra de lufa hacen de ella un buen soporte de inmovilización; sin embargo, debido a que la mayoría de los hidrocarburos son menos densos que el agua, es importante funcionalizarla para incrementar su flotabilidad, de manera que el sistema inmovilizado se mantenga en la interface aceite-agua que es en donde se lleva a cabo la degradación.

## 10. REFERENCIAS

---

- Acosta-Rubí, S. (2011). Enzimas involucradas en la degradación del 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano (DDT) por un hongo filamentoso. Tesis de Maestría no publicada. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN, México.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (1990). Public Health Statement, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services.
- Ahuja, D.K., Bachas, L.G., & Bhattacharyya, D. (2007). Modified Fenton reaction for trichlorophenol dechlorination by enzymatically generated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and gluconic acid chelate. *Chemosphere*, 66, 2193-2200.
- Alberton, D., Oliveira, L.S., Peralta, R.M., & Barbosa-Tessmann, I.P. (2007). Production, purification and characterization of a novel Galactose oxidase from *Fusarium acuminatum*. *Journal of Basic Microbiology*, 47, 203-212.
- Aldrett, S., Bonne J.S., Mills, M.A., Autenrieth, R.L., & Stephens, F.L. (1997). Microbial degradation of crude oil in marine environments tested in a flask experiment. *Water Research*, 31, 2840–2848.
- Alves, E., Lucas, G.C., Pozza, E.A., & de Carvalho A.M. (2013). Scanning electron microscopy for fungal sample examination. In *Laboratory Protocols in Fungal Biology* (pp. 133-150). Springer New York.
- Amara, D., Bernstein, L., Morse, D., & Horecker, B.L. (1963). Galactose oxidase of *Polyporus* a copper enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 238(7), 2281-2284.
- Anderson, J.W., Neff, J.M., Cox, B.A., Tatem, H.E., & Hightower, G.M. (1974). Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. *Marine Biology*, 27(1), 75-88.
- Anunciado, T.R., Sydenstricker, T.H.D., & Amico, S.C. (2005). Experimental investigation of various vegetable fibers as sorbent materials for oil spills. *Marine Pollution Bulletin*, 50, 1340–1346.
- Anotai, J., Lu, M., & Chewprecha, P. (2006). Kinetics of aniline degradation by Fenton and electro-Fenton processes. *Water Research*, 40, 1841-1847.

- Arriaga, S., & Revah, S. (2005) Improving hexane removal by enhancing fungal development in a microbial consortium biofilter. *Biotechnology and Bioengineering*, *90*, 107-115.
- Atlas, R.M. (1975). Effects of temperature and crude oil composition on petroleum biodegradation. *Journal of Applied Microbiology*, *30*(3), 396-403.
- Atlas, R.M. (1995). Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*, *31*(95), 178-182.
- Atlas, R.M., & Budosh, M. (1976). *Microbial degradation of petroleum in the Arctic*. En: J. M. Sharpley y A. M. Kaplan (Eds.). *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Biodegradation Symposium* (pp. 79-85). London: Applied Science Publishers.
- Atlas, R.M., & Hazen, T.C. (2011). Oil biodegradation and bioremediation: a tale of the two worst spills in U. S. history. *Environmental Science and Technology*, *45*(16), 6709–6715.
- Bamforth, M., & Singleton, I. (2005). Review Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *80*, 723–736. doi: 10.1002/jctb.1276.
- Bankar, S.B., Bule, M.V., Singhal, R.S., & Ananthanarayan, L. (2009). Glucose oxidase—an overview. *Biotechnology Advances*, *27*(4), 489-501.
- Barnett, H.L., & Barry, B. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi (4<sup>a</sup> ed.). St. Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society (pp. 234) Disponible en: [http://www.4shared.com/office/fjJ1ViDg/barnet\\_hunter\\_-\\_illustrated-g.html](http://www.4shared.com/office/fjJ1ViDg/barnet_hunter_-_illustrated-g.html)
- Baron, A.J., Stevens, C., Wilmot, C., Seneviratne, K.D., Blakeley, V., Dooley, D.M., Phillips, S.E.V., Knowles, P.F., & McPherson, M.J. (1994). Structure and mechanism of Galactose oxidase: the free radical site. *The Journal of Biological Chemistry*, *269*(40), 25095-25105.
- Barragán-Huerta, B.E. (2006). Aportación de los microorganismos asociados al grano verde de café en la degradación de plaguicidas organoclorados y su relación con la capacidad de adsorción del grano. Tesis de Doctorado no publicada. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN, México.
- Barragán-Huerta, B.E., Costa-Pérez, C., Peralta-Cruz, J., Barrera-Cortés, J., Esparza-García, F., & Rodríguez-Vázquez, R. (2007). Biodegradation of organochlorine pesticides by bacteria

- grown in microniches of the porous structure of green bean coffee. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 59(3), 239-244.
- Behera, S., & Ray, R.C. (2012). Comparison of *Luffa cylindrica* L. sponge discs and Ca-alginate gel beads as immobilized matrices of *Saccharomyces cerevisiae* for bio-ethanol production from sugarcane molasses. *African Journal of Biotechnology*, 11(95), 16172-16176.
- Beux, M.R., Yamamoto, C.I., Winter, C.M.G., Ramos, W.F., Barbieri, F.N., Ferreira, J.L., & Soccol, C.R. (2003). Bioprocess applied to the treatment of residual waters of coffee wet processing for the incorporation of selected yeast strains. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, 21(2), 379-392.
- Bezalel, L., Hadar, Y., & Cerniglia, C.E. (1997). Enzymatic mechanisms involved in phenanthrene degradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 2495–2501.
- Bhalerao, T.S., & Puranik, P.R. (2007). Biodegradation of organochlorine pesticide, endosulfan, by a fungal soil isolate, *Aspergillus niger*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 59(4), 315-321.
- Bolaños-García, Z. (2011). Bioaumentación en soporte de fibra de maguey mezcalero (*Agave angustifolia* Haw) para la degradación de hidrocarburos del petróleo en aguas saladas. Tesis de Licenciatura no publicada. Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca y Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN, México.
- Bolívar, C.P. (2009). Monografía sobre el galactomanano del grano de café y su importancia en el procesamiento para la obtención de café soluble. Tesis de Licenciatura publicado en línea. Escuela de Química, Facultad de Tecnologías, Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.
- Bradbury, A.G.W. (2001). Carbohydrates in coffee. En: ASIC (Eds.). *19<sup>th</sup> International Colloquium on the Chemistry of Coffee*. Paris: ASIC.
- Bradbury, A.G.W., & Halliday, D.J. (1990). Chemical structures of green coffee bean polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 389-392.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

- Brakstad, O.G. (2008). Natural and stimulated biodegradation of petroleum in cold marine environments. En: *Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology* (pp. 389-407). Berlin, Germany: Springer Berlin Heidelberg.
- Brito, E.M.S., Guyoneaud, R., Goñi-Urriza, M., Ranchou-Peyruse, A., Verbaere, A., Crapez, M.A.C., Wasserman, J.C.A., & Duran, R. (2006). Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. *Research in Microbiology*, 157, 752-762.
- Brooks J.R., Griffin V.K., & Kattan M.W. (1986). A modified method for total carbohydrate analysis of glucose syrups, maltodextrins and other starch hydrolysis products. *Cereal Chemistry*, 63(5), 465-466.
- Brown, J.A., Glenn, J.K., & Gold, M.H. (1990). Manganese regulates expression of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of bacteriology*, 172(6), 3125-3130.
- Bujang I.Z., Awang, M.K., & Ismail, A.E. (2007). Study on the dynamic characteristic of coconut fibre reinforced composites. En: M. J. Mohd Nor, S. Abdullah, N. Jamaluddin, R. Ismail. S. Mohamed Haris and A. Arifin (Eds.). *Regional Conference on Engineering Mathematics, Mechanics, Manufacturing and Architecture* (pp. 185-202). Noise, Vibration and Comfort Research Group.
- Burwood, R., & Speers, G.C. (1974). Photo-oxidation as a factor in the environmental dispersal of crude oil. *Estuarine and Coastal Marine Science*, 2, 117-135.
- Bushnell, L.D., & Haas, H.F. (1941). The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *Journal of Bacteriology*, 41(5), 653.
- Canet, R., Birnstingl, J.G., Malcom, D.G., Lopez-Real, J.M., & Beck, A.J. (2001). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by native microflora and combinations of white-rot fungi in a coal-tar contaminated soil. *Bioresource Technology*, 76, 113-117.
- Carmichael, L.M., & Pfaender, F.K. (1997). The effect of inorganic and organic supplements on the microbial degradation of phenanthrene and pyrene in soils. *Biodegradation*, 8(1), 1-13.
- Carrillo, L. (2003). Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta, Argentina.
- Cassidy, M.B., Lee, H., & Trevors, J.T. (1996). Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. *Journal of Industrial Microbiology*, 16, 79-101.

- Cavallazzi, J.R.P., Kasuya, C.M., & Soares, M.A. (2005). Screening of inducers for laccase production by *Lentinula edodes* in liquid medium. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36(4), 383-387.
- Cerniglia, C.E. (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 4, 331-338.
- Cerniglia, C.E., Gibson, D.T., & van Baalen, C. (1979). Algal oxidation of aromatic hydrocarbons: formation of 1-naphthol from naphthalene by *Agmenellum quadruplicatum*, strain PR-6. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 88, 50-58.
- Cerniglia, C.E., Gibson, D.T., & van Baalen, C. (1980a). Oxidation of naphthalene by cyanobacteria and microalgae. *Journal of General Microbiology*, 116, 495-500.
- Cerniglia, C.E., van Baalen, C., & Gibson, D.T. (1980b). Metabolism of naphthalene by the cyanobacterium *Oscillatoria sp.*, strain JCM. *Journal of General Microbiology*, 116, 485-494.
- Chaillan, F., Chaîneau, C.H., Point, V., Saliot, A., & Oudot, J. (2006). Factors inhibiting bioremediation of soil contaminated with weathered oils and drills cuttings. *Environmental Pollution*, 144(1), 255-265.
- Chaillan, F., Flècheb, A., Burya, E., Phantavonga, Y-hui, Saliot, A., & Oudot, J. (2004). Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Research in Microbiology*, 155(7), 587- 595.
- Chaîneau, C.H., Rougeux, G., Yéprémian, C., & Oudot, J. (2005). Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(8), 1490-1497.
- Chulalaksananukul, S., Gadd, G.M., Sangvanich, P., Sihanonth, P., Piapukiew, J., & Vangnai, A.S. (2006). Biodegradation of benzo (a) pyrene by a newly isolated *Fusarium sp.* *FEMS microbiology letters*, 262(1), 99-106.
- Clifford, M.N. (1975). The composition of green and roasted coffee beans. *Process Biochemistry*, 10, 13-16.
- Clifford, M.N. (1985). Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. En: M. N. Clifford y K. C. Wilson (Eds.). *Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage* (pp. 305-374). London: Croom Helm.



- Cohen, Y. (2001). Biofiltration - the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. *Bioresource Technology*, 77, 257-274.
- Cunningham, C.J., Ivshina, I.B., Lozinsky, V.I., Kuyukina, M.S., & Philp, J.C. (2004). Bioremediation of diesel-contaminated soil by microorganisms immobilized in polyvinyl alcohol. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 54, 167-174.
- Dai, Y. J., Ji, W.W., Chen, T., Zhang, W.J., Liu, Z.H., Ge, F., & Yuan, S. (2010). Metabolism of the neonicotinoid insecticides acetamiprid and thiacloprid by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain IM-2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(4), 2419-2425.
- Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*, 1-13. doi:10.4061/2011/941810.
- Department of Energy (DOE). (2012, Junio). *Annual Energy Outlook with Projections to 2035*. U.S.: Energy Information Administration. DOE/EIA-0383 (Junio 2012). Disponible en: [www.eia.gov/forcast/aeo](http://www.eia.gov/forcast/aeo).
- Donlan, R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881-90.
- dos Passos, C.T., Michelon, M., Burkert, J., Kalil, S.J., & Burkert, C.A.V. (2010). Biodegradation of phenol by free and encapsulated cells of a new *Aspergillus sp.* isolated from a contaminated site in southern Brazil. *African Journal of Biotechnology*, 9(40), 6716-6720.
- Dreywood, R. (1946). Qualitative test for carbohydrate material. *Industrial and Engineering Chemistry Analytical Edition*, 18(8), 499-499.
- Echarri, L. (1998) Ciencias de la Tierra y del Medio Ambiente. Editorial Teide, Madrid.
- Elizalde-González, M.P., Fuentes-Ramírez, L.E., & Guevara-Villa, M.R.G. (2009). Degradation of immobilized azo dyes by *Klebsiella sp.* UAP-b5 isolated from maize bioadsorbent. *Journal of Hazardous Materials*, 161(2), 769-774.
- Fahnestock von, F.M., Wickramanayake, G.B., Kratzke, R.J., & Major, W.R. (1998). Profile of existing contaminated soils. En: Fahnestock von F. M. (Eds.). *Biopile Design, Operation, and Maintenance Handbook for Treating Hydrocarbon-Contaminated Soils* (pp. 17-23). Columbus, Ohio: Battelle Press.

- Farag, S., & Soliman, N.A. (2011). Biodegradation of crude petroleum oil and environmental pollutants by *Candida tropicalis* strain. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(4), 821-830.
- Ferreira, C.S., Batista, L.R., Magalhães, L.A., Souza, E.D., & Freitas, R.S. (2008). Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. *Food Microbiology*, 25, 951–957.
- Folstar, P., van der Plas, H.C., Pilnik, W., & de Heus, J.G. (1977). Tocopherols in the unsaponifiable matter of coffee bean oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25, 283-285.
- Fontana, A.J. (2008). Appendix D: minimum water activity limits for growth of microorganisms. *Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications*, 405-405.
- Franco, M.J.G., Díaz-Cervantes, M.D., & Ruíz, V.C. (1990). Métodos de análisis utilizados para la evaluación de proteínas. Folleto no publicado. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN, México.
- Fritsche, W., & Hofrichter, M. (2008). Aerobic degradation by microorganisms. *Biotechnology Set*, Second Edition (pp. 144-167).
- Fujii, K., & Takeshi, K. (2007). *Penicillium* strains as dominant degraders in soil for coffee residue, a biological waste unsuitable for fertilization. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2713-2720.
- Galazzo, J., & Bailey, J. (1990). Growing *Saccharomyces cerevisiae* in calcium-alginate beads induces cell alterations, which accelerate glucose conversion to ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*, 36, 417-426.
- Garay-Tinoco, J., Ramírez, G., Betancourt, J., Marín, B., Cadavid, B., Panizzo, L., Lesmes, L., Sánchez, J.E., Lozano, H. & Franco, A. (2003). Manual de técnicas analíticas para la determinación de parámetros fisicoquímicos y contaminantes marinos: aguas, sedimentos y organismos. *Serie Documentos Generales*, 13. Disponible en: <http://www.invemar.org.co/redcostera1/invemar/docs/7010manualTecnicasanaliticas.pdf>
- Garzón, R.C., & Barragán, B.E. (2008). Inmovilización microbiana: técnicas y usos en el tratamiento de residuos tóxicos. *Revista Sistemas Ambientales*, 2(1), 23-34.

- Gernjak, W., Krutzler, T., Glaser, A., Malato, S., Caceres, J., Bauer, R., & Fernández-Alba, A.R. (2003). Photo-Fenton treatment of water containing natural phenolic pollutants. *Chemosphere*, *50*, 71–78.
- Goldstein, R.M., Mallory, L.M., & Alexander, M. (1985). Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. *Applied and Environmental Microbiology*, *50*(4), 977-983.
- Guerin, T.F. (1998). The extraction of aged polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) residues from a clay soil using sonication and a Soxhlet procedure: a comparative study. *Journal of Environmental Monitoring*, *1*(1), 63–67.
- Gutierrez, T., Singleton, D.R., Berry, D., Yang, T., Aitken, M.D., & Teske, A. (2013). Hydrocarbon-degrading bacteria enriched by the Deepwater Horizon oil spill identified by cultivation and DNA-SIP. *The ISME Journal*, *7*(11), 2091-2104.
- Ha, J., Cady, E.R., & Wild, J.R. (2009). Biodegradation of coumaphos, chlorferon, and diethylthiophosphate using bacteria immobilized in Ca-alginate gel beads. *Bioresource Technology*, *100*(3), 1138-1142.
- Han, M.J., Choi, H.T., & Song, H.G. (2004). Degradation of phenanthrene by *Trametes versicolor* and its laccase. *Journal of Microbiology-Seoul*, *42*(2), 94-98.
- Harayama, S., Kasai, Y., & Hara, A. (2004). Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Current Opinion in Biotechnology*, *15*, 205-214.
- Hazen, T.C., Dubinsky, E.A., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., Piceno, Y.M., Singh, N., Jansson J.K., Probst, A., Borglin, S.E., Fortney, J.L., Stringfellow, W.T., Bill, M., Conrad, M.E., Tom, L.M., Chavarria, K.L., Alusi, T.R., Lamendella, R., Joyner, D.C., Spier, C., Baelum, J., Auer, M., Zemla, M.L., Chakraborty, R., Sonnenthal, E.L., D’Haeseleer, P., Holman, H.Y.N., Osman, S., Lu, Z.M., van Nostrand, J.D., Deng, Y., Zhou, J.Z., & Mason, O.U. (2010). Deep-sea oil plume enriches indigenous oil-degrading bacteria. *Science*, *330*(6001), 204-208.
- Herrera, T., & Ulloa, M. (1990). El reino de los Hongos. Micología básica y aplicada. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hideno, A., Ogbonna, J.C., Aoyagi, H., & Tanaka, H. (2007). Acetylation of Loofa (*Luffa cylindrica*) Sponge as Immobilization Carrier for Bioprocesses Involving Cellulase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *103*(4), 311–317. doi: 10.1263/jbb.103.311.

- Huang, C., Han, L., Liu, X., & Ma, L. (2010). The rapid estimation of cellulose, hemicellulose, and lignin contents in rice straw by near infrared spectroscopy. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 33(2), 114-120.
- Iqbal, M., & Edyvean, R.G.J. (2004). Alginate coated loofa sponge discs for the removal of calcium from aqueous solutions. *Biotechnology Letters*, 26, 165-169.
- Irwin, R.J., van Mouwerik, M.A.R.K., Stevens, I., Seese, M.D., & Basham, W. (1997). Environmental contaminants encyclopedia nickel entry. *National Park Service Water Resources Divisions, WOB*, editor. Colorado. Disponible en: <http://www.nature.nps.gov/water/ecencyclopedia/index.cfm>.
- Izcapa-Treviño, C., Loera, O., Tomasini, A.C, Esparza-García, F., Salazar, J.M, Díaz-Cervantes M.D., & Rodríguez-Vázquez, R. (2009). Fenton (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe) reaction involved in *Penicillium sp.* culture for DDT [1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane] degradation Part B. *Journal of Environmental Science and Health*, 44(8), 798-804.
- Jeong, J., & Yoon, J. (2004). Dual roles of CO<sub>2</sub><sup>•-</sup> for degrading synthetic organic chemicals in the photo/ferrioxalate system. *Water Research*, 38(16), 3531-3540.
- Juhasz, A.L., & Naidu, R. (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 45, 57-88.
- Kamens, R.M., Zhi-Hua, F., Yao, Y., Chen, D., Chen, S., & Vartiainen, M. (1994). A methodology for modeling the formation and decay of nitro-PAH in the atmosphere. *Chemosphere*, 28(9), 1623-1632.
- Karigar, C.S., & Rao, S.S. (2011). Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. *Enzyme Research*. doi:10.4061/2011/805187
- Kim, S., Bae, W., Hwang, J., & Park, J. (2010). Aerobic TCE degradation by encapsulated toluene-oxidizing bacteria, *Pseudomonas putida* and *Bacillus spp.* *Water Science and Technology*, 62(9), 1991-1997.
- Klein, J., & Ziehr, H. (1990). Immobilization of microbial cells by adsorption. *Journal of Biotechnology*, 16(1), 1-15.

- Kostka, J.E., Prakash, O., Overholt, W.A., Green, S.J., Freyer, G., Canion, A., Delgardio, J., Norton, N., Hazen, T.C. & Huettel, M. (2011). Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in Gulf of Mexico beach sands impacted by the Deepwater Horizon oil spill. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(22), 7962-7974.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I.M., Marchant, R., & Koutinas, A.A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*, 21, 377-397.
- Kumar, A., Kumar, S., & Kumar, S. (2005). Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biochemical Engineering Journal*, 22(2), 151-159.
- Kumar, M., Leon, V., Materano, A.D.S., Ilzins, O.A., Galindo-Castro, I., & Fuenmayor, S.L. (2006). Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by biosurfactant-producing *Pseudomonas sp.* IR1. *Zeitschrift fur Naturforschung C-Journal of Biosciences*, 61(3-4), 203-212.
- Largo, E.P. (2010). Degradación de alcanos por células de *Alcanivorax venustensis* inmovilizadas en hidrogeles adhesivos y biodegradables. Tesis de Doctorado publicada en línea. Departamento de Bioquímica y Biología Celular, Universidad del País Vasco, España. ISBN: 978-84-694-0906-0.
- Lazarova, V., & Manem, J. (1995). Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water Research*, 29(10): 2227-2245.
- Lehr, W.J. (2001). Review of modeling procedures for oil spill weathering behavior. *Advances in Ecological Sciences*, 9, 51-90.
- Levin, L., Forchiassin, F., & Ramos, A.M. (2002). Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Mycologia*, 94(3), 377-383.
- Lide, D.R. (2007). CRC Handbook of Chemistry and Physics, 88TH Edition 2007-2008. CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton, FL.
- Lino, E.G., Carrard, S.C.A., Inagaki, S.Y., Tessmann, D.J., Kimmelmeier, C., & Barbosa-Tessmann, I.P. (2006). Production and characterization of Galactose oxidase produced by four isolates of *Fusarium graminearum*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(4), 557-562.
- Mackay, D., & Shiu, W.Y. (1981). A critical review of Henry's law constants for chemicals of environmental interest. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 10(4), 1175-1199.

- Madigan, M.T., Martiko, J.M., & Parker, J. (2004). *Brock, Biología de los Microorganismos* (10ª ed.). Madrid, España: Pearson Education, S. A.
- Marchand, M., Monfort, J.P., & Cortés-Rubio, A. (1981). Distribution of hydrocarbons in water and marine sediments after the Amoco Cadiz and Ixtoc-I oil spills. *Journal title unknown*, 487-509. Open Access version: <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/5368/>
- Marín-López, S.M., Arcila-Pulgarin, J., Montoya-Restrepo, E.C., & Olivero-Tascón, C.E. (2003). Cambios físico-químicos durante la maduración del fruto de café (*Coffea arabica* L. var. Colombia). *Cenicafé*, 208-225.
- Marrie, T., & Costerton, J. (1981). Prolonged survival of *Serratia marcescens* in chlorhexidine. *Applied and Environmental Microbiology*, 42(6), 1093-1102.
- Marroquín, G.J. (2007). Formación de sedimentos durante el hidrotratamiento catalítico de crudos pesados. Tesis de Doctorado publicada en línea. CINVESTAV-IPN, México.
- Mason, O.U., Hazen, T.C., Borglin, S., Chain, P.S.G., Dubinsky, E.A., Fortney, J.L., Han, J., Holman, H.Y.N., Hultman, J., Lamendella, R., Mackelprang, R., Malfatti, S., Tom, L.M., Tringe, S.G., Woyke, T., Zhou, J., Rubin, E.M., & Jansson, J.K. (2012). Metagenome, metatranscriptome and single-cell sequencing reveal microbial response to Deepwater Horizon oil spill. *The ISME Journal*, 6(9), 1715–1727.
- Masoud, W., & Jespersen, L. (2006). Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa. *International Journal of Food Microbiology*, 110(3), 291-296.
- McLellan, T.M., Aber, J.D., Martin, M.E., Melillo, J.M., & Nadelhoffer, K.J. (1991). Determination of nitrogen, lignin, and cellulose content of decomposing leaf material by near infrared reflectance spectroscopy. *Canadian Journal of Forest Research*, 21(11), 1684-1688.
- Miller, R.M., & Bartha, R. (1989). Evidence from liposome encapsulation for transport-limited microbial metabolism of solid alkanes. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(2), 269-274.
- Montgomery, C.D. (2007). *Diseño y análisis de experimentos*. (2ª ed.). Ciudad de México, México: Limusa Wiley (pp. 343-347).

- Morra, M.J. (1996). Bioremediation in soils: influence of soils properties on organic contaminants and bacteria. En: R. L. Crawford y D. L. Crawford (Eds.). *Bioremediation: Principles and Applications* (pp. 35-60). Cambridge: Cambridge University Press.
- Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z., & Labuzek, S. (2003). Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polish Journal of Environmental Studies*, 12(1), 15-25.
- NMX-AA-079-SCFI-2001 Análisis de aguas - determinación de nitratos en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas.
- O'Reilly, K., & Crawford, R. (1989). Kinetics of *p*-cresol degradation by an immobilized *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(4), 866-870.
- Okoh, A. (2006). Biodegradation alternative in the cleanup of petroleum hydrocarbon pollutants. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 1(2), 38-50.
- O'Neil, M.J. (2006). *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc.
- Oudot, J., Merlin, F.X., & Pinvidic, P. (1998). Weathering rates of oil components in a bioremediation experiment in estuarine sediments. *Marine Environmental Research*, 45(2), 113-125.
- Pal, D. (2012). Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons using agricultural wastes - Effect of lignin content. *International Conference on Chemical, Ecology and Environmental Sciences* (ICEES'2012), march 17-18, Bangkok. Disponible en: <http://psrcentre.org/images/extraimages/312115.pdf>.
- Phisalaphong, M., Budiraharjo, R., Bangrak, P., Mongkolkajit, J., & Limtong, S. (2007). Alginate-Loofa as Carrier Matrix for Ethanol Production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(3), 214-217. doi: 10.1263/jbb.104.214.
- Posada, F., & Vega, F.E. (2006). Inoculation and colonization of coffee seedlings (*Coffea arabica* L.) with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Mycoscience*, 47(5), 284-289.
- Qurashi, A.W., & Sabri, A.N. (2012a). Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(3), 1183-1191.

- Qurashi, A.W., & Sabri, A.N. (2012b). Biofilm formation in moderately halophilic bacteria is influenced by varying salinity levels. *Journal of Basic Microbiology*, 52(5), 566-572.
- Rabinovich, M.L., Bolobova, A.V., & Vasil'chenko, L.G. (2004). Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40(1): 1-17.
- Rafin, C., Potin, O., Veignie, E., Lounes-Hadj, A.S., & Sancholle, M. (2000). Degradation of benzo[a]pyrene as sole carbon source by a non white rot fungus, *Fusarium solani*. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 21, 311-329.
- Rafin, C., Veignie, E., Fayeulle, A., & Surpateanu, G. (2009). Benzo [a] pyrene degradation using simultaneously combined chemical oxidation, biotreatment with *Fusarium solani* and cyclodextrins. *Bioresource Technology*, 100(12), 3157-3160.
- Ramírez-Castillo, A. (2009). Biorremediación de agua contaminada con benceno y MTBE utilizando especies reactivas generadas a partir de microorganismos asociados al grano de café. Tesis de Maestría no publicada. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN, México.
- Reddy, C.M., Arey, J.S., Seewald, J.S., Sylva, S.P., Lemkau, K.L., Nelson, R.K., Carmichael, C.A., McIntyre C.P., Fenwick, J., & Ventura, T. (2012). Science applications in the Deepwater Horizon Oil Spill special feature: Composition and fate of gas and oil released to the water column during the Deepwater Horizon oil spill. *Proceedings of the National Academy of Science*, 109(50), 20229-20234.
- Redgwell, R., & Fischer, M. (2006). Coffee carbohydrates. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1): 165-174.
- Reid, E., Liu, X., & Judd, S.J. (2006). Effect of high salinity on activated sludge characteristics and membrane permeability in an immersed membrane bioreactor. *Journal of Membrane Science*, 283(1), 164-171.
- Reisfeld A., Rosenberg, E., & Gutnick, D. (1972). Microbial degradation of crude oil: factors affecting the dispersion in sea water by mixed and pure cultures. *Applied Microbiology*, 24(3), 363-368.



- Rickard, A.H., Gilbert, P., High, N.J., Kolenbrander, P.E., & Handley, P.S. (2003). Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in Microbiology*, 11(2), 94-100.
- Rodríguez, F.C. (2005). *Biotecnología Ambiental*. Editorial Tebar.
- Rodríguez-Vázquez, R. (2008). Informe final del contrato GPA-01-2008, PEMEX-Refinación: Remediación de 35,000 m<sup>3</sup> de suelo, subsuelo en la ex-refinería 18 de Marzo. Departamento de Biotecnología, CINVESTAV-IPN, México.
- Rodríguez-Vázquez, R. (2010). Informe final del contrato SRHM-C-021-2009: Remediación de suelo, subsuelo y manto acuífero en las instalaciones de ex-talleres de Ferrocarriles Nacionales de México en Mexicali, Estado de Baja California. Departamento de Biotecnología, CINVESTAV-IPN, México.
- Rodríguez-Vázquez, R. (2011). Informe final del contrato SRHM-C-022-2009: Remediación de suelo, subsuelo en las instalaciones de ex-talleres de Ferrocarriles Nacionales de México en Saltillo, Estado Coahuila. Departamento de Biotecnología, CINVESTAV-IPN, México.
- Rodríguez-Vázquez, R., Roldán-Martín, G.A., & Del Río Galván, C.P. (2011). *Proceso de biorremediación en cultivo sólido con la adición de granos de café*. Título de Patente No. 291975, otorgada por el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. Fecha de expedición: 9 de Noviembre de 2011.
- Roldán-Martín, A. (2006). Remoción de Hidrocarburos en un sistema de biopilas con adición de texturizantes. Tesis de Doctorado no publicada. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN, México.
- Roldán-Martín, A., Calva-Calva, G., Rojas-Avelizapa, N., Díaz-Cervantes, M. D., & Rodríguez-Vázquez, R. (2007). Solid culture amended with small amounts of raw coffee beans for the removal of petroleum hydrocarbon from weathered contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 60, 35-39.
- Rosenberg, E., & Ron, E.Z. (1996). Bioremediation of petroleum contamination. In: Crawford R.L., Crawford D.L. (Eds.) *Bioremediation: principles and applications*. Cambridge University Press, Cambridge.

- Rosenblueth, M., Martínez, L., Silva, J., & Martínez-Romero, E. (2004). *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(1), 27-35.
- Saeed, A., & Iqbal, M. (2013). Loofa (*Luffa cylindrica*) sponge: Review of development of the biomatrix as a tool for biotechnological applications. *Biotechnology Progress*, 29(3), 573-600.
- Salloum, M.J., Chefetz, B., & Hatcher, P.G. (2002). Phenanthrene sorption by aliphatic-rich natural organic matter. *Environmental Science and Technology*, 36(9), 1953-1958.
- San Juan, R.F.D.V., Arrarás, I.R., de Provens, E.C.P., & Santos, J.M.D. (2006). Estimación de la capacidad de retención de agua en el suelo: revisión del parámetro CRA. Investigación agraria. *Sistemas y Recursos Forestales*, 15(1), 14-23.
- Sander, R. (2015). Compilation of Henry's law constants (version 4.0) for water as solvent. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 15(8), 4399-4981.
- Sangster, J. (1989). Octanol-water partition coefficients of simple organic compounds. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 18(3), 1111-1229.
- Sarma, S.J., & Pakshirajan, K. (2011). Surfactant aided biodegradation of pyrene using immobilized Cells of *Mycobacterium frederiksbergense*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65(1), 73-77. doi:10.1016/j.biod.2010.09.004.
- Satyanarayana, K.G., Kulkarni, A.G., & Rohatgi, P.K. (1981). Structure and properties of coir fibres. *Proceedings of the Indian Academy of Science (Engineering Sciences)*, 4(4), 419-436.
- Sautour, M., Mansur, C.S., Divies, C., Bensoussan, M., & Dantigny, P. (2002). Comparison of the effects of temperature and water activity on growth rate of food spoilage moulds. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(6), 311-315.
- Schwarz, F.P. (1977). Determination of temperature dependence of solubilities of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous solutions by a fluorescence method. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 22(3), 273-277.
- Silva, C.F., Batista, L.R., Abreu, L.M., Dias, E.S., & Schwan, R.F. (2008). Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee *Coffea arabica* fermentation. *Food Microbiology*, 25(8), 951-957.

- Silva, C.F., Schwan, R.F., Sousa Dias, E., & Wheals, A.E. (2000). Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 60(2), 251-260.
- Silva, I.S., Grossman, M., & Durrant, L.R. (2009). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2-7 rings) under microaerobic and very-low-oxygen conditions by soil fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63(2), 224-229.
- Singh, R., Paul, D., & Jain, R.K. (2006). Biofilms: implications in bioremediation. *TRENDS in Microbiology*, 14(9), 389-397.
- Siqueira, G., Bras, J., & Dufresne, A. (2010). *Luffa cylindrica* as a lignocellulosic source of fiber, microfibrillated cellulose and cellulose nanocrystals. *BioResources*, 5(2), 727-740.
- Smith, V.H., Graham, D.W., & Cleland, D.D. (1998). Application of Resource-Ratio Theory to hydrocarbon biodegradation. *Environmental Science and Technology*, 32(21): 3386-3395.
- Song, S.H., Choi, S.S., Park, K., & Yoo, Y.J. (2005). Novel hybrid immobilization of microorganisms and its applications to biological denitrification. *Enzyme and Microbial Technology*, 37: 567–573. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.07.012.
- Speer, K., & Kölling-Speer, I. (2006). The lipid fraction of the coffee bean. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1): 201-216.
- Speer, K., Sehat, N., & Montag, A. (1993). Fatty acids in coffee. En: ASIC (Eds.). *15<sup>th</sup> International Colloquium on the Chemistry of Coffee* (pp. 583-592). Paris: ASIC.
- Swannell, R. P., Lee, K., & McDonagh, M. (1996). Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiological Reviews*, 60(2), 342-365.
- Tanobe, V.O., Sydenstricker, T.H., Munaro, M., & Amico, S.C. (2005). A comprehensive characterization of chemically treated Brazilian sponge-gourds (*Luffa cylindrica*). *Polymer Testing*, 24(4), 474-482.
- Tavanti, A., Davidson, A.D., Gow, N.A., Maiden, M.C., & Odds, F.C. (2005). *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(1), 284-292.
- ten Have, R., & Teunissen, P.J. (2001). Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi. *Chemical Reviews*, 101(11), 3397-3414.

- Tressel, P.S., & Kosman, D.J. (1982). Galactose oxidase from *Dactylium dendroides*. *Methods in Enzymology*, 89, 163-171.
- U.S. Environmental Protection Agency (EPA). (1996). Method 3510-C. Separatory funnel liquid-liquid extraction, Revision 3. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3510c.pdf>
- U.S. Environmental Protection Agency (EPA). (1986). Method 8310. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, Revision 0. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/8310.pdf>
- U.S. Congress, Office of Technology Assessment (OTA). (1991). Bioremediation for marine oil spills. Background Paper, OTA-BP-0-70. Washington, D. C.: U.S. Government Printing Office.
- van Pee, W. & Castelein, J.M. (1972). Study of the pectinolytic microflora, particularly the *Enterobacteriaceae*, from fermenting coffee in the Congo. *Journal of Food Science*, 37(1), 171-174.
- Velázquez-Aradillas, J.C., Toribio, J.J., González, M.C., Bautista, F., Cebrián, M.E., Esparza-García, F., & Rodríguez-Vázquez, R. (2010). Characterization of a biosurfactant produced by a *Bacillus cereus* strain tolerant to cadmium and isolated from green coffee grain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(4): 907-913. doi:0.1007/s11274-010-0533-1.
- Verdin, A., Sahraoui, A.L.H., & Durand, R. (2004). Degradation of benzo [a] pyrene by mitosporic fungi and extracellular oxidative enzymes. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 53(2), 65-70.
- Verschueren, K. (2001). *Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals*. Volumes 1-2. 4th ed. John Wiley & Sons. New York, NY.
- Viéitez, J.M. (2007). *La marea negra del Prestige*. En: P. Castro & M. Huber (Eds.). *Biología Marina*, (Apéndice E, pp. 452-457). España: McGraw-Hill Interamericana. ISBN: 0-07-283064-4.
- Vilela, D.M., Pereira, G.V.D.M., Silva, C.F., Batista, L.R., & Schwan, R.F. (2010). Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). *Food Microbiology*, 27(8), 1128-1135.

- Wackett, L.P., & Gibson, D.T. (1988). Degradation of trichloroethylene by toluene dioxygenase in whole-cell studies with *Pseudomonas putida* F1. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(7), 1703-1708.
- Waigi, MG., Kang, F., Goikavi, C., Ling, W., & Gao, Y. (2015). Phenanthrene biodegradation by sphingomonads and its application in the contaminated soils and sediments: a review. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 104, 333-349.
- Wasik, S.P., Miller, M.M., Tewari, Y.B., May, W.E., Sonnefeld, W.J., De Voe, H., & Zoller, W.H. (1983). Determination of the vapor pressure, aqueous solubility, and octanol/water partition coefficient of hydrophobic substances by coupled generator column/liquid chromatographic methods. En: *Residue Reviews* (pp. 29-42). Springer New York. Hansch, C., Leo, A., D. Hoekman. Exploring QSAR - Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants. Washington, DC: American Chemical Society., 1995., p. 118
- Westlake, D.W.S. (1982). Microorganisms and the degradation of oil under northern marine conditions. En: Sprague JB, Vandermeulen JH, Wells PG (Eds.). *Oils and dispersants in Canadian seas – research appraisal and recommendations* (pp. 47-50). Ottawa, Canada: Environmental Protection Service Canada, Publication EPS-3- EC-82-2.
- Whittaker, M.M., & Whittaker, J.W. (1988). The active site of Galactose oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(13), 6074-6080.
- Wick, A.F., Haus, N.W., Sukkariyah, B.F., Haering, K.C., & Daniels, W.L. (2011). Remediation of PAH-contaminated soils and sediments: a literature review. *Virginia Polytechnic Institute and State University, USA*, 102.
- Wiesel, I., Wübker, S.M., & Rehm, H.J. (1993). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by an immobilized mixed bacterial culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39, 110-116.
- Wilson, N.G., & Bradley, G. (1996). Enhanced degradation of petrol (Slovene diesel) in an aqueous system by immobilized *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Bacteriology*, 80, 99-104.
- Wilson, N.G., & Bradley, G. (1997). A study of a bacterial immobilization substratum for use in the bioremediation of crude oil in a saltwater system. *Journal of Applied Microbiology*, 83, 524-530.

- Wong, P.K., & Yuen, P.Y. (1996). Decolorization and biodegradation of methyl red by *Klebsiella pneumoniae* RS-13. *Water Research*, 30(7), 1736-1744.
- Wong, P.K., & Yuen, P.Y. (1998). Decolourization and biodegradation of N, N'-dimethyl-p-phenylenediamine by *Klebsiella pneumoniae* RS-13 and *Acetobacter liquefaciens* S-1. *Journal of Applied Microbiology*, 85(1), 79-87.
- Wunder, T., Kremer, S., Sterner, O., & Anke, H. (1994). Metabolism of the polycyclic aromatic hydrocarbon pyrene by *Aspergillus niger* SK 9317. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42, 636-641.
- Yan, J., Wang, L., Fu, P.P., & Yu, H. (2004). Photomutagenicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons from the US EPA priority pollutant list. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 557(1), 99-108.
- Zhou, L., Li, G., An, T., Fu, J., & Sheng, G. (2008). Recent patents on immobilized microorganism technology and its engineering application in wastewater treatment. *Recent Patents on Engineering*, 2(1), 28-35.
- Zhu, X., Venosa, A.D., & Suidan, M.T. (2004). Literature review on the use of commercial bioremediation agents for cleanup of oil-contaminated estuarine environments. EPA/600/R-04/075 (Julio 2004).
- Zúñiga-Silva, R. (2009). Papel de la oxaloacetasa (OAH) y la glioxal oxidasa (GLOX) en el proceso de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Tesis de maestría no publicada. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN, México.

## ANEXOS

### Anexo A: Análisis de varianza y de regresión del diseño de experimentos Plackett-Burman

9 Días

#### Modelo de Regresión (Tipo I)

Factor	Ajuste		No Ajustado	
	Modelo		Modelo	
	Coeficiente		Coeficiente	
	Estimado	Valor de p	Estimado	Valor de p
Intercepto	47.59		43.82	
<i>A-NaNO<sub>3</sub></i>	-20.56	0.0094	-20.93	0.0168
<i>B-Peptona</i>	13.45	0.0214	13.08	0.0566
<i>C-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	-16.36	0.0146	-16.74	0.0305
<i>D-MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</i>	4.75	0.1408	5.13	0.3210
<i>E-CaCO<sub>3</sub></i>	-13.51	0.0334	-15.02	0.0689
<i>F-FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</i>	9.02	0.0459	9.40	0.1181
<i>G-Tween 80 al 4%</i>	0.61	0.7896	0.99	0.8343
<i>Ctr Pt 1</i>	-12.81	0.0739		

#### ANOVA para el modelo factorial seleccionado

##### Análisis de varianza tabla [Suma Parcial de Cuadrados- Tipo III]

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Valor De F	Valor Prob > F	
Modelo	7353.20	7	1050.46	36.41	0.0270	<b>significativo</b>
<i>A-NaNO<sub>3</sub></i>	3042.55	1	3042.55	105.44	0.0094	
<i>B-Peptona</i>	1303.14	1	1303.14	45.16	0.0214	
<i>C-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	1927.47	1	1927.47	66.80	0.0146	
<i>D-MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</i>	162.74	1	162.74	5.64	0.1408	
<i>E-CaCO<sub>3</sub></i>	821.54	1	821.54	28.47	0.0334	
<i>F-FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</i>	586.34	1	586.34	20.32	0.0459	
<i>G-Tween 80 al 4%</i>	2.67	1	2.67	0.093	0.7896	
Curvature	347.72	1	347.72	12.05	0.0739	
Pure Error	57.71	2	28.85			
Cor Total	7758.64	10				

## **Anexo B: Carta de aceptación del artículo por Journal of Environmental Science and Health, Part A.**

JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND HEALTH, PART A

Toxic/Hazardous Substance & Environmental Engineering

[www.tandfonline.com/LESA](http://www.tandfonline.com/LESA)

Editor: Dr. Shahamat U. Khan  
**Department of Chemistry & Biochemistry, MSN 3E2**  
**Planetary Hall, Room 301**  
**George Mason University**  
**4400 University Drive**  
**Fairfax, Virginia 22030-4444, U.S.A.**  
**Phone: (703) 993-1072; Fax: (703) 993-1055**  
E-mail: [skhan6@gmu.edu](mailto:skhan6@gmu.edu)

January 12, 2016

**Dr. Refugio Rodríguez-Vázquez**

Department of Biotechnology and Bioengineering,  
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional,  
Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco,  
Zip Code 07279, Mexico City, Mexico

Dear Dr. Rodríguez-Vázquez,

RE: Production of a halotolerant biofilm from green coffee beans immobilized on loofah fiber (*Luffa cylindrica*) and its effect on phenanthrene degradation in seawater  
Ms.#A-4230

We are pleased to inform you that our reviewers have recommended the publication of the above noted paper in its present form. They feel that the paper is well presented and does not require any changes and/or additions. However, we note that the paper still needs some minor editorial corrections that would be incorporated in the manuscript in our office

Your paper will be sent to the publisher and placed into production for publication in the J. Environ. Sci. Health, Part A. When the final version of your manuscript will be posted online, the volume, issue and page numbers of your paper, as it will appear in the printed copy of the journal, will be available.

Galley proofs of the paper along with the copyright agreement and offprint order form will be sent by the Taylor & Francis to the corresponding author by e-mail. Publication of the manuscript may be delayed if the copyright agreement and corrected proof copy are not returned promptly to the publisher.

We thank you for choosing this journal for publishing your research and hope that you will consider doing so again in the future.

Sincerely yours,  
Shahamat U. Khan