



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**Caracterización de una microbiota aislada de materiales orgánicos
en la remoción de HPA e HTP en presencia de sustancias húmicas**

César García Díaz

TESIS DOCTORAL

Director: Dra. Josefina Barrera Cortés

México, D.F.

2013

Comité Tutorial

Dra. Josefina Barrera Cortés (Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN)

Dra. María Teresa Ponce Noyola (Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN)

Dr. Fernando José Esparza García (Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN)

Dr. Alessandro Piccolo (Università di Napoli "Federico II" – Italia)

Dr. José Adelfo Escalante Lozada (Instituto de Biotecnología, UNAM)

Dr. Juan Méndez Vivar (Departamento de Química, UAM-I)

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado para la realización de esta tesis a través de la beca de estudios No.199742 y el proyecto CB-2010-156837; así como, a la beca mixta otorgada para realizar una estancia en la Università di Napoli "Federico II" en Nápoles Italia.

Agradezco al IMP por permitirme tener acceso a los laboratorios.

Agradezco al CINVESTAV por la beca terminal otorgada para la conclusión de la tesis.

A la Dra. Josefina por el apoyo incondicional tanto personal como académico, que me brindo a lo largo de la realización del proyecto.

A la Dra. María Teresa por hacerme observaciones valiosas para la conclusión de este trabajo.

Al Dr. Fernando Esparza por su consejos; así como, el auxiliar de investigación M. en C. Carlos Cruz y el auxiliar técnico Teresa Rodríguez.

Al Dr. Rafael Martínez Palou por apoyarme desinteresadamente e incondicionalmente en la obtención de sustancias húmicas modificadas.

Al Profesor Alessandro Piccolo, Dr. Antonio Nebbioso, Dr. Ricardo Spaccini, Dr. Davide Savy, Dr. Pierluigi Mazzei y Dra. Susanna Nuzzo por su valioso apoyo y conocimiento; así como, su calidez en la conclusión de ésta tesis.

A la Dra. Flor Rivera por su apoyo, amistad y consejos.

Al Dr. Frédéric Thalasso, Dr. Luis Bernardo Flores, Dr. y al Dr. Luc Dendooven por permitirme el acceso ilimitado a sus laboratorios en la Planta Piloto del Departamento, para llevar a cabo los análisis de la caracterización de los materiales empleados en este proyecto.

A los auxiliares de investigación, M. en C. Héctor Suárez, M. en C. Joel Alba Flores y M. en C. Marcos Luna por su apoyo técnico para la realización de la tesis.

A la auxiliar de investigación M. en C. Claudia Ivonne Flores Pucheta por el valioso tiempo y apoyo que me brindo para la conclusión de este trabajo.

A la M. en C. Elvira Rios Leal y el auxiliar técnico Cirino Chávez, por su apoyo técnico cromatográfico y consejos académicos brindados.

A mis padres y hermano

Por estar ahí cuando más los necesité, estar siempre conmigo y apoyarme una vez más en esta etapa de mí vida y seguir orientándome para ser una mejor persona, gracias.

A mi novia

Claudia Ivonne Flores Pucheta por apoyarme en cada momento, en los momentos difíciles, compartir buenos momentos a su lado y brindarme su cariño, gracias.

A mis amigos

Vicente Peña, Karina García, Juan Suárez, Mauricio García, Rigel Gómez, Selene Gómez, Gabriela Robles, Pablo López y Fernando Cuevas, que me brindaron infinidad de consejos para mi superación personal y académica; y que me permitieron pasar buenos momentos con ustedes, gracias.

A mis compañeros

Por su compañía y amistad que me brindaron; y porque con su compañía el camino recorrido fue mucho más sencillo, gracias.

Contenido

GLOSARIO.....	
RESUMEN)
ABSTRACT.....	:
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 LOS SUELOS	1
1.1.1 COMPOSICIÓN DEL SUELO.....	2
1.2 EL PETRÓLEO	4
1.2.1 COMPOSICIÓN DEL PETRÓLEO CRUDO.....	4
1.2.2 LOS HIDROCARBUROS Y LA CONTAMINACION	5
1.2.3 FORMAS DE CONTAMINACION POR LA OPERACIÓN PETROLERA	6
1.2.4 CAUSAS DE DERRAMES POR LA ACTIVIDAD PETROLERA.....	7
1.3 TECNOLOGÍAS DE REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS (IN-SITU, EX-SITU)	8
1.3.1 BIORREMEDIACIÓN.....	9
1.3.2 LAVADO DE SUELO	19
1.4 MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LAS SH	22
2 JUSTIFICACIÓN	24
3 HIPÓTESIS	25
4 OBJETIVOS	26
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	26
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
5 MATERIALES.....	27
5.1 BAGACILLO DE CAÑA (BC).....	27
5.2 LOMBRIZ (L).....	27
5.3 VERMICOMPOSTA (VC)	27
5.4 EXTRACTO DE LEONARDITA (EL).....	27
5.5 SUELOS	28
5.6 REACTIVOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA REMOCIÓN HPA	29
5.7 REACTIVOS PARA LA MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LAS SUSTANCIAS HÚMICAS Y LAVADO DE SUELOS	29
6 MÉTODOS	30
6.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	30
6.1.1 Etapa 1	32
6.1.2 Etapa 2	38
6.1.3 Etapa 3	42
6.1.4 Etapa 4.....	43
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	56
7.1 ETAPA 1	56
7.1.1 Aislamiento de microorganismos de los materiales orgánicos.....	56

7.1.2	Evaluación de la capacidad de remoción de HPA por mezclas de las MT	64
7.1.3	Evaluación de la capacidad de remoción de HPA por mezclas de la MBT.....	72
7.1.4	Evaluación de la capacidad de remoción de HPA por mezclas de CM	75
7.2	ETAPA 2	84
7.2.1	Identificación de los microorganismos del CM	84
7.2.2	Remoción de HPA como única fuente de carbono	90
7.2.3	Evolución del CM en el proceso de remoción de HPA	93
7.3	ETAPA 3	100
7.3.1	Discusión de la eficiencia de remoción del cultivo mixto seleccionado y un cultivo mixto comercial, en la remoción de HTP e HPA en presencia/ausencia de sustancias húmicas y nutrientes.	100
7.4	ETAPA 4	115
7.4.1	Purificación de los ácidos húmicos	115
7.4.2	Caracterización química.....	115
7.4.3	Modificación química de las SH bajo irradiación de microondas	122
7.4.4	Esterificación de las SH mediante catálisis de transferencia de fase (método modificado)	129
8	CONCLUSIONES	157
9	RECOMENDACIONES	159
10	BIBLIOGRAFIA	160
11	ANEXO	183

Indice de Figuras

Figura 1. Estrategia experimental para la remoción de HPA de suelos reales contaminados	47
Figura 2. DEFG establecido para evaluar la presencia del inóculo y sustancias húmicas	58
Figura 3. Estructura química simplificada de las SH	65
Figura 4. Estructura simplificada de las SH	65
Figura 5. Esquema de reacción para las SH esterificadas/eterificadas	66
Figura 6. Esterificación asistida por microondas de las sustancias húmicas (SH)	67
Figura 7. Esterificación/eterificación mediante calefacción asistida por microondas/convencional en reacción de CTF de las sustancias húmicas	68
Figura 8. Esterificación/eterificación en reacción de CTF de las sustancias húmicas	70
Figura 9. Microbiota asociada al BC	74
Figura 10. Microbiota asociada a la VC	75
Figura 11. Microbiota asociada al EL	76
Figura 12. Microbiota asociada a la L	77
Figura 13. Cinética de crecimiento de algunas bacterias hidrocarbonoclastas aisladas	80
Figura 14. Cronograma empleado para preparar los inóculos de los cuatro materiales orgánicos	81
Figura 15. Porcentaje de remoción de HPA por la MHT	82
Figura 16. Porcentaje de remoción de HPA por la MT en presencia de EL (ácidos húmicos)	84
Figura 17. Porcentaje de remoción de HPA por la MT en ausencia de EL (ácidos húmicos)	84
Figura 18. Crecimiento positivo y negativo de algunos microorganismos en presencia de HPA	86
Figura 19. Variación de la tensión superficial en el tratamiento de las MHT	87
Figura 20. Bacterias del sistema compuesto por EL, VC, BC y L del tratamiento 1	88
Figura 21. Hongos del sistema compuesto por EL, VC, BC y L del tratamiento 1	88
Figura 22. Porcentaje de remoción de HPA por la MT bioestimulada	90
Figura 23. Porcentaje de remoción de HPA por la MT bioestimulada en presencia de EL	91
Figura 24. Porcentaje de remoción de HPA por la MT bioestimulada en ausencia de EL	91
Figura 25. Porcentaje de remoción de HPA por la MHS	92
Figura 26. Porcentaje de remoción de HPA por la MHS en presencia de la microbiota del EL	93

Figura 27. Porcentaje de remoción de HPA por la MHS ausencia de la microbiota del EL93	
Figura 28. Porcentaje de remoción de Acenaftileno por las MHS	97
Figura 29. Porcentaje de remoción de Acenafteno por las MHS	98
Figura 30. Porcentaje de remoción de Fenantreno por las MHS	98
Figura 31. Porcentaje de remoción de Antraceno por las MHS	99
Figura 32. Porcentaje de remoción de Fluoranteno por las MHS	99
Figura 33. Porcentaje de remoción de Criseno por las MHS	100
Figura 34. Porcentaje de remoción de Benzo[a]pireno por las MHS	100
Figura 35. Árbol de filogenético de la MHS	104
Figura 36. Evolución de la evaporación de los HPA durante el tratamiento	109
Figura 37. Remoción de HPA como única fuente de carbono por la MHS	110
Figura 38. Evolución microbiana de la MHS durante la remoción de HPA	111
Figura 39. Cinéticas de remoción de HPA y crecimiento microbiano	113
Figura 40. Amplificación del gen <i>rpoB</i> (tamaño esperado 350pb, marcador 100 pb)	114
Figura 41. DGGE del gen <i>rpoB</i> para las bacterias en estudio	115
Figura 42. DGGE del gen <i>rpoB</i> para la MHS durante los tres puntos de muestreo	116
Figura 43. Cinéticas de remoción de HTP mediante la adición de SH e inóculos a diferentes concentraciones de hidrocarburos	119
Figura 44. Comparación de la remoción de HTP (después de 34 días) entre inóculos y el efecto de absorción por las SH	124
Figura 45. Efecto de las SH sobre la remoción de HTP por los inóculos (CM y CMC)	127
Figura 46. Resultados estadísticos que muestran las interacciones entre las SH y los inóculos	129
Figura 47. Ácidos Húmicos y Fúlvicos	132
Figura 48. Espectros FTIR de las SH	135
Figura 49. CPMAS ¹³ C RMN del SH	136
Figura 50. Espectros de NMR ¹ H de los AH	137
Figura 51. Composición de los AH y AF determinadas por pirolisis	138
Figura 52. Remoción de HTP por AH no modificados/modificados	142
Figura 53. Remoción de HTP por AF no modificados/modificados	142

Figura 54. Espectros de IR del proceso de mejora de la reacción de O-alkilación de AH	150
Figura 55. Espectro del producto de reacción 1 usando bromuro de bencilo (Piccolo, 2006)	151
Figura 56. Espectro de Infrarrojo de los espectros alkilados de los AH	152
Figura 57. Espectros de IR del proceso de mejora de la reacción de O-alkilación de AF	154
Figura 58. Espectro NMR ^1H de la alkilación de los AH	156
Figura 59. Espectros de CPMAS ^{13}C NMR de los AH alkilados	158
Figura 60. Espectros de HPSEC de los AH alkilados	160
Figura 61. Remoción de HPAs por los derivados bencilados	164
Figura 62. Remoción de HPAs por los derivados pentilados	165
Figura 63. Remoción de HPAs por los derivados metilados	166
Figura 64. Efecto de las interacciones entre las variables involucradas en la remoción de HPA	169
Figura 65. Comparaciones de eliminación de HPA entre los derivados de los AH y tensoactivos comerciales	172
Figura 66. Principio de la catálisis de transferencia de fase	201
Figura 67. Ubicación de la región de las microondas en el Espectro Electromagnético	203
Figura 68. Diagramas representativos de una cavidad monomodal	205
Figura 69. Horno monomodal Discover™	206

Indice de Tablas

Tabla 1. Tecnologías de remediación Ex situ de acuerdo a la EPA	24
Tabla 2. Tecnologías de remediación Ex situ de acuerdo a la EPA continuación	25
Tabla 3. Textura de los suelos empleados en la evaluación de los ácidos húmicos modificados en la remoción de HPA	44
Tabla 4. Mezclas de las MH de los materiales orgánicos (en 55 ml) de los tratamientos	52
Tabla 5. Análisis realizados para caracterizar las SH	60
Tabla 6. Microorganismos hidrocarbonoclastas observados	73
Tabla 7. Microorganismos hidrocarbonoclastas aislados	73
Tabla 8. Propiedades fisicoquímicas y biológicas de los materiales orgánicos	78
Tabla 9. Microorganismos hidrocarbonoclastas empleados	79
Tabla 10. Porcentaje de remoción de HPA de los tratamientos (EL + BC) y (L + VC + BC)	83
Tabla 11. Microorganismos que crecieron en presencia de los HPA en estudio	85
Tabla 12. Microorganismos hidrocarbonoclastas empleados para formar los inóculos de la MHS	92
Tabla 13. Remoción de HPA en presencia de Queroseno por los cultivos mixtos y sus mezclas de los materiales orgánicos	94
Tabla 14. Evaporación de HPA en los sistemas	97
Tabla 15. Números de acceso, asignación taxonómica y genotipo de las secuencias	105
Tabla 16. Efecto del Queroseno en la remoción de HPA por el tratamiento AH + BC	108
Tabla 17. Microorganismos en común entre los AH y el BC	112
Tabla 18. Caracterización fisicoquímica y biológica de los materiales utilizados	122
Tabla 19. Composición del combustóleo y el porcentaje de remoción del sistema contaminado con 5000 mgHTP/kg en presencia del CM y AF + CM	131
Tabla 20. Acidez de las sustancias húmicas al pH de trabajo	132
Tabla 21. Composición Elemental de las Sustancias Húmicas (%)	133
Tabla 22. Modificación de las variables de reacción en el mejoramiento del proceso de O-alquilación	147
Tabla 23. Peso molecular de los AH alquilados	159
Tabla 24. Condiciones de reacción 7, empleando HTBA	161
Tabla 25. Milimoles de agente alquilante incorporado a los ácidos húmicos (mM)	162
Tabla 26. Eficiencia de alquilación de los ácidos húmicos (%)	162

GLOSARIO

AF	Ácidos fúlvicos
AH	Ácidos húmicos
BC	Bagacillo de Caña
CM	Cultivo Mixto Hidrocarbonoclasta
CMS	Cultivo Mixto Hidrocarbonoclasta Seleccionada
CMC	Cultivo Mixto Comercial
EL	Extracto de Leonardita
HPA	Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos
HTP	Hidrocarburos Totales del Petróleo
L	Lombriz
MB	Microbiota Bioestimulada
MT	Microbiota Total
S	Suelo
SH	Sustancias húmicas
VC	Vermicomposta

CPMAS ¹³C NMR

Cross-Polarization Magic Angle Spinning, Carbon Nuclear Magnetic Resonance (Resonancia Magnética Nuclear de Carbono)

FTIR Fourier Transform Infrared (Infrarojo por la transformada de Fourier)

HPSEC High Performance Size Exclusion Chromatography (Cromatografía de exclusion molecular de alto rendimiento)

NMR ¹H Proton Nuclear Magnetic Resonance (Resonancia Magnética Nuclear de protón)

Resumen

La estimulación biológica de los microorganismos y las interacciones fisicoquímicas (xenobiótico – agente/mecanismo de desorción), son la base de algunas tecnologías aplicadas actualmente a la remediación de suelos contaminados. Se ha sugerido que el desarrollo de una tecnología que combine estos dos principios aumentará la eficiencia de recuperación de suelos contaminados. Así, se definieron dos objetivos principales para mejorar los tiempos de remediación de suelos contaminados con hidrocarburos empleando bioaumentación e interacciones fisicoquímicas. Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar el efecto de la incorporación de un inóculo derivado de los materiales orgánicos: vermicomposta (VC), bagacillo de caña (BC), extracto de leonardita (EL) y lombriz (L) *Eisenia andrei* en la remoción de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) e hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) como: acenaftileno, acenafteno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, criseno y benzo[a]pireno; en presencia / ausencia de sustancias húmicas.

Para evaluar el nivel de remoción de los HPA, tres sistemas microbianos o inóculos derivados de los materiales orgánicos fueron establecidos: las microbiotas totales (MT), microbiotas bioestimuladas totales (MBT) y cultivos mixtos (CM). El primer inóculo fue obtenido mediante dilución del material orgánico en agua isotónica estéril mientras que el segundo fue incubado en caldo nutritivo por 24h. El tercer inóculo estuvo integrado por los microorganismos aislados por la técnica de dilución y siembra en placa previo a un enriquecimiento de los microorganismos hidrocarbonoclastas en medio mineral suplementado con queroseno en un lapso de un mes. Así, se aislaron 140 microorganismos hidrocarbonoclastas de los cuales 100 fueron bacterias y el restante hongos filamentosos.

El nivel de remoción de los HPA se evaluó empleando un diseño experimental combinatorio sin repeticiones para cada inóculo (MT, MBT o CM), por lo que se definieron 15 unidades experimentales o combinaciones de inóculos. En esta etapa se evaluó la capacidad de los inóculos para remover HPA en presencia de queroseno. Los sistemas removieron en promedio entre un 13 y un 71% a los HPA, siendo los sistemas experimentales binarios, los que presentaron mayor nivel de remoción. El CM integrado por BC + EL (integrado por 44 bacterias) presentó la mayor tasa de remoción entre los diversos inóculos (MT, MBT o CM), de acuerdo con el análisis estadístico. Este sistema fue evaluado en la remoción de los HPA (3 o más anillos) como única fuente de carbono (ausencia de queroseno) observándose una disminución en la remoción de un 25%.

Se identificaron 12 géneros bacterianos en este sistema (BC + EL) los cuales fueron: *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Delftia*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Kocuria*, *Mycobacterium*, *Naxibacter*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas* y *Streptomyces*. De las 44 bacterias aisladas, diecinueve pertenecen al Filo Actinobacteria, dieciséis al Filo Proteobacteria; siete al Filo Firmicutes y dos solo se identificaron a nivel de dominio siendo clasificadas como bacterias.

La incorporación de estos microorganismos, en presencia/ausencia de sustancias húmicas, permitió incrementar la velocidad y nivel de remoción de HTP de un suelo contaminado con combustóleo, hasta 50 veces (5000, 20000, 50000 mgHTP/kg) en comparación con un sistema bioestimulado solo con sales minerales.

Otro objetivo del presente trabajo fue contribuir en la búsqueda de una tecnología de lavado innovadora y amigable con el medio ambiente para remediar suelos contaminados con HTP e HPA y diferentes texturas, empleando sustancias húmicas (SH) cuyas propiedades anfipáticas fueron mejoradas mediante reacciones químicas modificando los principales grupos reactivos de la molécula con grupos reactivos tales como bencilo, pentilo y metilo; así como, hidrocarburos alifáticos de cadena larga (C8 – C18). La modificación fue verificada por espectrofotometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), resonancia magnética nuclear de protón (NMR ^1H) y resonancia magnética nuclear de carbono (CPMAS ^{13}C NMR); así como, mediciones de cromatografía de exclusión molecular de alto rendimiento (HPSEC). En este trabajo las SH (ácidos húmicos (AH) y ácidos fúlvicos (AF)) fueron modificados químicamente por esterificación / eterificación bajo calentamiento convencional o por irradiación de microondas; así como, catálisis de transferencia de fases.

La eficiencia de la modificación química de las SH se incrementó bajo irradiación de microondas con respecto a la de calentamiento convencional. Los resultados mostraron que las SH modificadas favorecieron más la remoción de los HTP e HPA de los suelos en estudio que las SH nativas. Los mejores resultados en la remoción de HTP, se obtuvieron con el AH modificado con dodecanol y el AF modificado con decanol, los cuales aumentaron la remoción en un 24% y 18% respectivamente con respecto a los derivados no modificados. Los derivados mantuvieron su solubilidad en agua e incrementaron su solubilidad en disolventes orgánicos. La remoción de los HPA por los derivados se incrementó entre 9 y 20 veces, siendo los derivados de metilo y bencilo los mejores. La remoción de los HPA se vio afectada por la textura del suelo, siendo más afectada en presencia de partículas más finas como la arcilla. La remoción de un suelo franco-arenoso-arcilloso, se incrementó de una a 20 veces por los derivados de bencilo, mientras que el suelo franco arcilloso, se incrementó de una a nueve veces respecto a los ácidos húmicos sin modificar. Los derivados obtenidos tuvieron casi la misma eficiencia de remoción que los tensoactivos artificiales en solución; tal como, Tritón X100 y SDS.

Abstract

Biological stimulation of microorganisms and physicochemical interactions (xenobiotic - agent/desorption mechanism), are the basis of some technologies currently applied to the remediation of contaminated soils. It has been suggested that the development of a technology that combines these two principles will increase the efficiency of recovery of contaminated soils. Thus, two main objectives were defined in order to decrease the remediation time of soils contaminated with hydrocarbons by using bioaugmentation and physicochemical interactions. One objective was to evaluate the effect of the addition of an inoculum derived from organic materials: vermicompost (VC), sugarcane bagasse (SCB), leonardite extract (LE) and earthworm (EaW) *Eisenia andrei* in the removal of total petroleum hydrocarbons (TPH) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) such as acenaphthylene, acenaphthene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, chrysene and benzo[a] pyrene, in the presence/absence of humic substances.

To assess the PAH removal level, three microbial systems or inocula derived from organic materials were established: total microbiota (TM), total microbiota biostimulated (TMB) and mixed cultures (MC). The first inoculum was obtained by dilution of each organic material in sterile isotonic water while the second was incubated in nutrient broth for 24 hours. The third inoculum was composed of the organisms isolated by the technique of dilution and plating prior to an enrichment of hydrocarbonoclastic microorganisms in mineral medium supplemented with kerosene in one month of incubation. Thus, 140 hydrocarbonoclastic microorganisms were isolated which 100 were bacteria and the remaining were filamentous fungi.

The PAH removal level was evaluated using a combinatorial experimental design without repetitions for each inocula (TM, TMB or MC) so 15 experimental units or combinations were defined for each inoculum. At this stage was evaluated the capacity of inocula to remove PAH in the presence of kerosene. Systems removed an average between 13 and 71 % of PAH where the experimental binary systems, were those with higher removal levels. According to the statistical analysis, the MC composed by SCB + LE (composed of 44 bacteria) had the highest removal rate between the different inocula (TM, TMB or MC). This system was evaluated for removal of PAH (3 or more rings) as sole carbon source (absence of kerosene) observing a decrease in the removal of 25%.

We identified 12 bacterial genera in this system (SCB + LE) which were: *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Delftia*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Kocuria*, *Mycobacterium*, *Naxibacter*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas* and *Streptomyces*. From the 44 isolated bacteria, nineteen belong to the phylum Actinobacteria, sixteen to phylum Proteobacteria, seven to phylum Firmicutes and two were identified only at the domain level being classified as bacteria.

The incorporation of these microorganisms in the presence/absence of humic substances, allowed to increase the PAH removal level and speed of soil contaminated with fuel oil (5000, 20000 or 50000 mgTPH/kg) up to 50 times compared to a system biostimulated only minerals.

Another objective of this study was to contribute to the search for innovative washing and environmental friendly technology to remediate soils contaminated with TPH and PAH with different textures. To reach the objective, humic substances' (HS) amphipathic properties were improved by chemical reactions in order to modified their main reactive groups (carboxyl and hidroxy) with reactive groups such as benzyl, pentyl and methyl as well as long chain aliphatic hydrocarbons (C8 - C18). The modification was checked by Fourier transform infrared (FTIR) and proton (NMR ^1H) and carbon (^{13}C CPMAS NMR) nuclear magnetic resonance as well as measurements of high performance size exclusion chromatography (HPSEC). In this work the HS (humic (HA) and fulvic acids (FA)) were chemically modified by esterification/etherification under conventional heating or microwave irradiation, as well as phase transfer catalysis.

The efficiency of chemical modification of HS was increased under microwave irradiation with respect to conventional heating. The results showed that the modified HS favored more the TPH and PAH removal than the native HS. The best results in the TPH removal, were obtained with the modified HA with dodecanol and modified FA with decanol, which increased the removal by 24% and 18 % respectively, compared to unmodified derivatives. Derivatives maintained their solubility in water and increased their solubility in organic solvents. Removal of PAH increased between 9 and 20 times more, with the methyl and benzyl derivatives. The removal of PAH was affected by soil texture, being more affected in the presence of fine particles such as clay. The removal of a sandy - loam - clay soil increased from one to 20 times more with benzyl derivatives, while the clay - loam soil was increased from one to nine times compared to unmodified humic acids. The derivatives obtained had almost the same removal efficiency that artificial surfactants in solution, such as Triton X100 and SDS.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 LOS SUELOS

Se denomina suelo al sistema estructurado, biológicamente activo, que tiende a desarrollarse en la superficie de las tierras emergidas por la influencia de la intemperie y de los seres vivos. Se trata de un sistema formado por componentes minerales, componentes orgánicos (humus y derivados, biomasa viva y muerta), gas (aire en el espacio existente en los poros), y agua envolviendo partículas y el espacio capilar. El suelo constituye la interfaz entre la tierra, el aire y el agua, lo que le confiere la capacidad de desempeñar tanto funciones naturales como de uso antropogénico.

Los suelos proporcionan soporte físico y nutrientes para el crecimiento de las plantas y los microorganismos. Existe en ellos una gran variedad de microorganismos (bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoarios) que casi siempre están presentes en ellos, aunque las densidades de población de las mismas varían ampliamente. La superficie de los suelos constituye el lugar donde se producen la mayoría de las reacciones bioquímicas pertenecientes al ciclo de la materia orgánica, el nitrógeno y otros minerales, a la meteorización de las rocas y a la toma de nutrientes por parte de las plantas (Alexander 1999). Las propiedades físicas y químicas de los suelos influyen en gran manera sobre la aireación, la disponibilidad de nutrientes y la retención de agua y, por lo tanto, en la actividad biológica. Las propiedades más importantes de las que engloban estos grupos son el tamaño de partícula, la porosidad, la humedad, estado de aireación, composición química, fracción de arcilla, capacidad de intercambio de cationes y fracción orgánica. El tamaño de partícula afecta a la química de la superficie de los suelos y al tamaño de los poros. La cantidad de poros depende de la textura, estructura y contenido de materia orgánica del suelo.

1.1.1 COMPOSICIÓN DEL SUELO

La matriz de un suelo está compuesta por cinco componentes principales:

- **Minerales:** Los materiales minerales constituyen los principales componentes estructurales de los suelos y suponen más del 50% del volumen total.
- **Aire y agua:** Conjuntamente constituyen el volumen de poros, que, por lo general, ocupa entre el 25 y 50% del volumen total. La proporción aire y agua varía considerablemente con la humedad del suelo.
- **Organismos vivos:** Ocupan menos del 1% del volumen.
- **Materia orgánica:** Oscilan entre el 3 y 6% del volumen, con valor medio.

1.1.1.1 LA FRACCIÓN MINERAL

El mineral predominante en un suelo es el dióxido de silicio. Igualmente se encuentran en abundancia el aluminio y el hierro, mientras que el calcio, magnesio, potasio, titanio, manganeso, nitrógeno, azufre, sodio y fósforo están presentes en menor cuantía ([Alexander 1999](#)). La composición química varía de un suelo a otro y, en un mismo suelo, a diferentes profundidades. Los microorganismos obtienen parte de los nutrientes que necesitan de la fracción mineral del suelo, siendo dichos nutrientes nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, azufre, hierro, calcio, manganeso, zinc, cobre y molibdeno. Sin embargo los microorganismos pueden disponer con facilidad únicamente de una pequeña parte de estos minerales, convirtiéndolos más en una provisión de lento empleo, que en una fuente de rápido uso.

Los suelos se clasifican según el tamaño de sus partículas teniendo en cuenta tres componentes principales:

Arcilla	Pasa por un tamiz de 0.002 mm
Limo	Queda retenido en el tamiz de 0.002 mm pero pasa a través del tamiz de 0.05 mm
Arena	Queda retenida en el tamiz de 0.05mm aunque pasa a través del de 2mm

La arcilla constituye el tipo de partícula que mayor efecto produce sobre las propiedades de un suelo, principalmente debido a la alta actividad superficial que la caracteriza. La mayor parte de sus partículas son de naturaleza coloidal, tienen una carga superficial negativa y de forma plana; además, son buenos absorbentes de agua, iones y gases. Aquellas partículas que quedan retenidas en el tamiz de 2mm de paso se clasifican como grava o piedra. Las de mayor tamaño, como la arena, no tienen el mismo nivel de actividad superficial. Los principales efectos asociados a las partículas de arena están relacionados con el tamaño del poro del suelo y, por tanto, con el movimiento del aire y el agua a través del mismo (las arenas no afectan en gran medida a las propiedades químicas y biológicas del suelo). La presencia en un suelo de superficies que absorban con gran intensidad determinadas clases de compuestos pueden reducir la disponibilidad de compuestos orgánicos para la biodegradabilidad. También afecta la disponibilidad de nutrientes la capacidad de intercambio de cationes en el suelo de los minerales arcillosos y los compuestos orgánicos que constan de zonas con carga eléctrica superficial negativa

1.1.1.2 MATERIA ORGÁNICA DE UN SUELO

La fracción orgánica del suelo está compuesta por: residuos de plantas, animales y microorganismos. Es el producto resultante del metabolismo microbiano, comúnmente llamado humus. El humus es materia orgánica que ha sufrido varias degradaciones y transformaciones. Está compuesto en su mayor parte por sustancias polimerizadas: compuestos aromáticos, polisacáridos aminoácidos, polímeros del ácido urónico y compuestos que contienen fósforo (Alexander 1999). Mucha de la materia orgánica de un suelo, en particular el humus, es ligeramente soluble únicamente en agua y de alguna forma, resistente a la biodegradación. El material húmico tiene propiedades coloidales y una carga neta negativa; por lo tanto, la importancia que tiene en el proceso de formación de complejos órgano-metálicos es considerable.

1.2 EL PETRÓLEO

El petróleo es el producto de la degradación anaeróbica de materia orgánica, durante largos períodos de tiempo y bajo condiciones de alta presión y temperatura, que la convierte en gas natural, crudo y derivados del petróleo. El petróleo crudo es una mezcla extremadamente compleja y variable de compuestos orgánicos, donde la mayoría de los ellos son hidrocarburos, que varían en peso molecular desde el gas metano hasta los altos pesos moleculares de alquitranes y bitúmenes. Estos hidrocarburos pueden presentarse en un amplio rango de estructuras moleculares como son: cadenas lineales y ramificadas, anillos sencillos, condensados o aromáticos. Los dos grupos principales de hidrocarburos aromáticos son los monocíclicos como el benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX) y los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) tales como el naftaleno, antraceno, fenantreno entre otros (Guha et al. 1998) de los cuales se ha demostrado que tienen una alta toxicidad para los organismos vivos (Li et al. 2001). La toxicidad de los HPA y la hidrofobicidad aumenta con el número de anillos, por lo que la desintoxicación de los sitios contaminados dependerá de desorción de los HPA de la matriz donde se encuentran, que pasa a ser más difícil en suelos con un tamaño de partícula menor.

1.2.1 COMPOSICIÓN DEL PETRÓLEO CRUDO

El petróleo crudo se caracteriza por ser un líquido negro, viscoso y con una composición química sumamente compleja, pudiendo contener un sinnúmero de compuestos, básicamente de la familia de los hidrocarburos (Rosini 1960). Los hidrocarburos hacen parte de la familia predominante de compuestos, por lo que constituyen uno de los grupos de contaminantes ambientales más importantes, tanto por su abundancia, como por su persistencia en distintos compartimentos ambientales (Casellas et al. 1995).

La composición elemental de un crudo está condicionada por la predominancia de los compuestos tipo hidrocarburo: 84 a 87% de carbono (C), 11 a 14% de hidrógeno (H), de 0 a 8% de azufre (S), y de 0 a 4% de oxígeno (O), nitrógeno (N) y metales como el níquel y el vanadio (Clark y Brown 1977; Howe-Grant 1996).

Los principales componentes se subdividen y purifican en distintas fracciones:

- **Fracción saturada:** N-alcanos, alcanos ramificados con cadenas alquílicas, las cicloparafinas o cicloalcanos y los hopanos.
- **Fracción aromática:** Hidrocarburos monoaromáticos, diaromáticos y policíclicos aromáticos.
- **Fracción de resinas:** Agregados de piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos y amidas.
- **Fracción de asfaltenos:** Agregados de HPA, ácidos nafténicos, sulfuros, ácidos grasos, metaloporfirinas, fenoles polihidratados. Son menos abundantes y consisten en compuestos más polares, pudiéndose encontrar hidrocarburos heterocíclicos, hidrocarburos oxigenados y agregados de alto peso molecular ([Pineda y Mesta-Howard 2001](#)).

1.2.2 LOS HIDROCARBUROS Y LA CONTAMINACION

La contaminación del suelo se puede definir como un exceso de cualquier elemento o compuesto, a través de la exposición directa o secundaria, lo que provoca una reacción tóxica a la biota o humanos, resultando en un riesgo inaceptable para el medio ambiente ([Abrahams 2002](#), [Vangronsveld et al. 2009](#)). La contaminación de suelos con compuestos orgánicos e inorgánicos se produce en todo el mundo y por lo tanto más técnicas de desintoxicación ambientales se requieren ([Bhandari et al. 2007](#)).

Desde el inicio de la actividad petrolera, el entorno en el que se desarrolla, se ve afectado por numerosas intervenciones que dañan severamente el medio ambiente. Las huellas más evidentes que se encuentran en todo el planeta donde se ha dado extracción de petróleo, frecuentemente han sido ocasionadas por accidentes en tanques de almacenamiento o en oleoductos. Sin embargo los accidentes que son los acontecimientos más notorios no son las únicas fuentes de contaminación o degradación del medio, ni siquiera las más importantes. Todas las actividades que están envueltas en la exploración y explotación del petróleo provocan impactos potencialmente negativos sobre el medio ambiente y sobre las personas que lo usan o que están en contacto con él. Gran parte de los

ecosistemas afectados por la exploración y explotación de hidrocarburos cuentan con formas de vida muy diversas y complejas.

Varias tecnologías tales como los métodos físicos ([Khodadoust et al. 2011](#)), los métodos químicos ([Romero et al. 2011](#)), biorremediación ([Perez-de-Mora et al. 2011](#)), remediación electrocinética ([Zhang y Rusling 1995](#)), la tecnología térmica ([Acharya y Ives 1994](#)), y fotocátalisis ([Balmer et al. 2000](#)) se han empleado para remediar los suelos contaminados por hidrocarburos. Con el aumento de la severidad de las normas industriales y el incremento de valor de los terrenos, los métodos con alta eficiencia y rapidez en la recuperación de suelos, se están convirtiendo en una necesidad.

1.2.3 FORMAS DE CONTAMINACION POR LA OPERACIÓN PETROLERA

La operación sísmica: Es una de las más utilizadas en la etapa de exploración, y consiste en la medición de las ondas de resonancia que produce la detonación de cargas de dinamita. Esto significa que la zona explorada queda completamente llena de agujeros dinamitados. Al encontrarse el lugar donde probablemente se puede dar la explotación del mineral, se procede a abrir los pozos exploratorios.

La fase exploración: Durante este proceso son utilizados lodos químicos, los cuales son altamente contaminantes, para la mayor penetración en el terreno de los taladros que deben ser enfriados constantemente con agua. También se construyen piscinas para depositar las aguas acidas y los lodos contaminados que salen junto con el petróleo. Esta fase altera el equilibrio natural, ya que requiere de grandes cantidades de agua del lugar y aumenta los niveles de contaminación. También en las perforaciones se producen lodos con metales pesados y tóxicos como cadmio, cobre, arsénico, mercurio y plomo.

La fase de extracción: Comienza cuando alguno de los pozos exploratorios toca un yacimiento. En tierra o en mar las operaciones a realizarse en esta etapa alteran el ambiente natural y lo contaminan. Esta etapa presenta riesgos adicionales de accidentes, relacionados con gases tóxicos, aguas acidas y los depósitos de crudo.

El transporte: Se da después de la extracción del crudo. El transporte del crudo es una de las etapas más riesgosas y costosas en términos de destrucción ambiental. Desde que se transporta el crudo masivamente, son millones de barriles que se han derramado en zonas selváticas, ríos, lagos y mares. Las consecuencias de tales derrames continúan afectando estos ecosistemas muchos años después. Dentro de las etapas de exploración y explotación también se da una compactación de los suelos por la maquinaria pesada donde por la pérdida de vegetación, se produce una erosión y contaminación de los suelos de la zona. Los microorganismos del suelo son alterados por la contaminación con hidrocarburos, desapareciendo o disminuyendo las especies menos resistentes sin dejar atrás las altas tasas de mutaciones. Las alteraciones al suelo producen cambios en el pH de este y del agua, que pueden causar un deterioro crónico de los ecosistemas.

1.2.4 CAUSAS DE DERRAMES POR LA ACTIVIDAD PETROLERA

Las causas más frecuentes de contaminación en la industria petrolera por transporte por medio de tubería u oleoducto, son:

Falla operacional: Se da por un desajuste o asincronismo en la actividad normal de la operación de un oleoducto, un poliducto o estación, ya sea en la manipulación de los instrumentos o en la parte operativa por parte de los operadores, que ocasiona una sobrepresión de la línea de transporte.

Fatiga de Materiales: Ocasionado por el inadecuado mantenimiento de las instalaciones, llámese tubo, pozo o múltiple abastecimiento, provocando un agujero por el cual se genera una fuga del líquido.

Hurto: Cuando los terceros que acometen el hecho punible no tienen por motivo nada distinto que obtener un lucro con el crudo que extraen de la tubería.

Acto terrorista: Es aquel que se atribuye por lo general a grupos u organizaciones armadas que enarbolando un carácter político acometen el daño con el interés de desestabilizar.

1.3 TECNOLOGÍAS DE REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS (IN-SITU, EX-SITU)

La necesidad de restaurar los sitios contaminados con hidrocarburos, propició el desarrollo de tecnologías físicas y químicas, exclusivamente. Posteriormente después de la década de los 70's se inició el desarrollo de la biorremediación. De esta manera en la actualidad, la remediación de un suelo puede llevarse a cabo por dos diferentes métodos, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA por sus siglas en inglés) clasifica a las tecnologías de remediación en dos grandes grupos: las tecnologías ex-situ, y las tecnologías in-situ (USEPA 2008). En la primera se requiere de excavación, o de cualquier otro proceso para remover el suelo contaminado antes de su tratamiento que puede realizarse en el mismo sitio (on site) o fuera de él (off site) y las tecnologías in-situ, que se refieren al tratamiento del sitio contaminado en el mismo lugar. En la [Tabla 1](#) y [2](#), se presentan las tecnologías de remediación ex-situ e in-situ respectivamente, comprendidas dentro de la EPA (EPA 2008).

Tabla 1. Tecnologías de remediación Ex situ de acuerdo a la EPA

TECNOLOGÍAS (EX SITU)	PRINCIPIO
TRATAMIENTO QUÍMICO	Se basa en la adición de agentes químicos oxidativos
INCINERACIÓN ON-SITE	Tratamiento térmico hasta CO ₂ en el mismo lugar
BIORREMEDIACIÓN	Empleo de organismos vivos
INCINERACIÓN OFF-SITE	Tratamiento térmico hasta CO ₂ en incineradores especiales fuera del área
SOLIDIFICACIÓN Y ESTABILIZACIÓN	Empleo de materiales de la construcción, cemento, limos hidratados entre otros para inmovilizar al contaminante
NEUTRALIZACIÓN	Empleo de agentes alcalinos para neutralizar suelos ácidos y permitir la remediación
VITRIFICACIÓN	El suelo contaminado se mezcla con arena de vidrio y se hace pasar una corriente eléctrica; para formar bloques de vidrio con el suelo contaminado
AIREACIÓN MECÁNICA SEPARACIÓN FÍSICA	Se emplea para eliminar compuestos volátiles empleando la aireación Los contaminantes se extraen y/o separan del medio contaminado, aprovechando sus propiedades físicas o químicas (volatilización, solubilidad, carga eléctrica)
LAVADO DE SUELOS	Los contaminantes adsorbidos en las partículas finas del suelo son removidos con el uso de soluciones acuosas en un suelo excavado

Tabla 2. Tecnologías de remediación In situ de acuerdo a la EPA

TECNOLOGÍAS (IN SITU)	PRINCIPIO
EXTRACCIÓN DE VAPOR	Recuperación de componentes volátiles empleando corrientes de vapor
SOLIDIFICACIÓN Y EXTRACCIÓN	Empleo de materiales de la construcción, cemento, limos hidratados entre otros para inmovilizar al contaminante
BIORREMEDIACIÓN LAVADO DE SUELO	Empleo de organismos vivos para la desintoxicación de los suelos contaminados Los contaminantes sorbidos en las partículas finas del suelo son removidos con el uso de soluciones acuosas en un suelo excavado
RECUPERACIÓN TÉRMICA	Utilizan calor para incrementar la volatilización (separación) de los contaminantes en un suelo
FITORREMEDIACIÓN	La fitorremediación es un proceso que utiliza plantas para remover, transferir, estabilizar, concentrar y/o destruir contaminantes (orgánicos e inorgánicos) en suelos, lodos y sedimentos
EXTRACCIÓN DOBLE FASE	Este tipo de procesos, utiliza solventes orgánicos para disolver los contaminantes y así removerlos del suelo

1.3.1 BIORREMEDIACIÓN

La biorremediación es una tecnología que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos (fundamentalmente bacterias, pero también hongos y algas) para transformar contaminantes orgánicos en compuestos más simples poco o nada contaminantes, y, por tanto, se puede utilizar para limpiar terrenos o aguas contaminadas ([Glazer y Nikaido 1995](#)).

Su ámbito de aplicabilidad es muy amplio, pudiendo considerarse como objeto cada uno de los estados de la materia ([Atlas y Unterman 1999](#)):

- **Sólido:** Con aplicaciones sobre medios contaminados como suelos o sedimentos, o bien directamente en lodos, residuos, etc.
- **Líquido:** Aguas superficiales y subterráneas, aguas residuales
- **Gases:** Emisiones industriales, así como productos derivados del tratamiento de aguas o suelos

También se puede realizar una clasificación en función de los contaminantes con los que se puede trabajar ([Alexander 1999](#)):

- **Hidrocarburos:** alifáticos, aromáticos, BTEX, HPA, etc.
- **Hidrocarburos clorados:** PCB, pesticidas, herbicidas, etc.
- **Compuestos nitroaromáticos:** TNT y otros
- **Metales pesados:** estos no se metabolizan por los microorganismos de manera apreciable, pero pueden ser inmovilizados o precipitados.
- **Otros contaminantes:** compuestos organofosforados, cianuros, fenoles, etc.

Los microorganismos transforman y metabolizan aeróbicamente los hidrocarburos y otros compuestos orgánicos hasta dióxido de carbono, agua y fuentes de alimento para sustentar su crecimiento y reproducción, es decir, la biodegradación ocurre naturalmente. Es conocido que los microorganismos indígenas tienen la capacidad de adaptarse y eventualmente degradar cualquier compuesto orgánico natural sin asistencia del hombre; sin embargo, esta adaptación requiere la presencia de condiciones ambientales apropiadas tales como el pH, temperatura, el aceptor final de electrones (que en procesos aeróbicos es el oxígeno), concentraciones de contaminante no tóxicas para los microorganismos y adecuadas condiciones de humedad y conductividad del medio, entre las más importantes. La ausencia de alguna o varias de las anteriores condiciones puede limitar parcial o totalmente la actividad biológica y es cuando la mano del hombre juega un papel fundamental en la optimización del proceso, ya sea mejorando estas condiciones para aumentar la población de microorganismos (bioaumentación) y/o manipulando genéticamente los microorganismos para la degradación específica de algunos compuestos químicos.

1.3.1.1 FUNDAMENTACIÓN BIOQUÍMICA DE LA BIODEGRADACIÓN

Todos los compuestos naturales complejos (lignina, ácidos húmicos, etc.) y la mayor parte de los compuestos xenobióticos pueden ser degradados, o al menos sufrir una biodegradación primaria, por los microorganismos ([Alexander 1999](#)). Sin embargo, la mineralización sólo es posible si existe la ruta metabólica completa para degradar los metabolitos intermediarios hasta la formación de CO_2 y H_2O (ambientes aerobios) o CH_4 y CO_2 (ausencia de oxígeno).

El fundamento bioquímico de la biorremediación se basa, principalmente, en la serie de reacciones de óxido-reducción (cuyo fin es la obtención de energía) que se producen en la cadena respiratoria, o transportadora de electrones de las células. La cadena la inicia un sustrato orgánico (compuestos hidrocarburos) que es externo a la célula y que actúa como donador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia ([Madigan et al. 2003](#)). Los aceptores más comúnmente utilizados por los microorganismos son el oxígeno, los nitratos, el hierro (III), los sulfatos y el dióxido de carbono. Cuando el oxígeno es utilizado como aceptor de electrones la respiración microbiana se produce en condiciones aerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo aerobio; sin embargo, si utiliza los sulfatos o el dióxido de carbono se produce en condiciones reductoras o anaerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo anaerobio.

1.3.1.2 FACTORES QUE CONDICIONAN LA BIORREMEDIACIÓN DE UN SUELO

La biodegradabilidad de una mezcla de hidrocarburos presente en un suelo contaminado depende de diversos factores, los cuales pueden clasificarse en cuatro grupos:

- Medio ambientales
- Físicos
- Químicos
- Microbiológicos

1.3.1.2.1 FACTORES MEDIO AMBIENTALES

Los factores medio ambientales son aquellos necesarios a la hora de proporcionar las condiciones óptimas para el crecimiento de los microorganismos que llevan a cabo la recuperación. Los microorganismos son muy sensibles a los cambios de temperatura, pH, disponibilidad de nutrientes, oxígeno y humedad.

pH: Afecta significativamente la actividad microbiana. En consecuencia, cuanto mayor sea la diversidad de microorganismos existentes, potencialmente mayor será el rango de tolerancia. No existen unas condiciones preestablecidas que sean óptimas en todos los casos, pero en términos generales el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos es máximo dentro de un intervalo de pH situado entre 6 y 8. En general, el pH óptimo para las bacterias heterótrofas es neutro (pH 6 - 8), mientras que es más ácido para los hongos (pH 4 - 5). El pH óptimo establecido para procesos de biodegradación es neutro (pH 7,4 - 7,8) (Dibble y Bartha 1979). Así mismo el pH también afecta directamente en la solubilidad del fósforo y en el transporte de metales pesados en el suelo.

Temperatura: Es uno de los factores ambientales más importantes que afecta la actividad metabólica de los microorganismos y la tasa de biodegradación. Generalmente, las especies bacterianas crecen a intervalos de temperatura bastante reducidos, entre 20 y 30°C (condiciones mesófilas), decreciendo la biodegradación por desnaturalización de las enzimas a temperaturas superiores a 40°C e inhibiéndose a inferiores a 0°C. Sin embargo, también se ha dado la biodegradación de hidrocarburos a temperaturas extremas.

Humedad: Los microorganismos requieren unas condiciones mínimas de humedad para su crecimiento. El agua forma parte del protoplasma bacteriano y sirve como medio de transporte a través del cual los compuestos orgánicos y nutrientes son movilizados hasta el interior de las células. Un exceso de humedad inhibirá el crecimiento bacteriano al reducir la concentración de oxígeno en el suelo. Por lo anterior, la humedad del suelo puede limitar de forma severa la biodegradación, fundamentalmente en suelos superficiales afectados por oscilaciones importantes en el contenido de

agua. No obstante el nivel óptimo de humedad depende de las propiedades de cada suelo, el tipo de contaminación y si la biodegradación es aeróbica o anaeróbica.

Oxígeno: Es el aceptor final de electrones generalmente empleado en procesos biológicos y también es necesario en determinados tipos de reacciones de oxidación-reducción catalizada por enzimas. Los microorganismos, oxidan compuestos orgánicos o inorgánicos, obteniendo así la energía necesaria para su crecimiento. El proceso de oxidación da lugar a electrones que intervienen una cadena de reacciones en el interior de la célula y, al final, deben ser vertidos en el entorno. El aceptor final de electrones es el receptor de los mismos y, en el caso de un metabolismo aerobio, es el aceptor y H₂O es el producto. La mayor parte de hidrocarburos presentes en los productos petrolíferos son degradados con mayor extensión y rapidez de forma aeróbica; ya que en ausencia de O₂, y en presencia de aceptores de electrones alternativos (como NO³⁻, SO₄²⁻, CO₂, Mn⁴⁺ y Fe³⁺) los hidrocarburos pueden ser degradados, pero con unas tasas de biodegradación muy inferiores a las aeróbicas ([Boopathy 2000](#)).

Nutrientes inorgánicos: El metabolismo microbiano está orientado a la reproducción de los organismos y éstos requieren que los constituyentes químicos se encuentren disponibles para su asimilación y síntesis. Los nutrientes principalmente requeridos son el fósforo y el nitrógeno, por tanto, las concentraciones asimilables de dichos elementos presentes en el suelo, suelen ser limitantes para un incremento y activación de la población microbiana, mientras que otros nutrientes esenciales como el calcio, sodio, hierro o sulfato; ya están presentes en cantidades suficientes ([Menn et al. 2000](#)). La adición de fuentes de N y P inorgánicas, generalmente tiene un efecto positivo incrementando las poblaciones microbianas y las tasas de biodegradación de hidrocarburos en suelos contaminados ([Chaineau et al. 2003](#)). Las proporciones molares de C:N:P, descritas en la bibliografía, respecto al contenido de carbono a degradar son muy distintas; el rango normal de C:N:P depende del sistema de tratamiento a emplear, siendo de modo habitual 100:10:1. Aunque en general la adición de fuentes inorgánicas de N y P al suelo es beneficiosa para los procesos de biodegradación, de igual manera, el uso excesivo de nutrientes inorgánicos también puede inhibir los procesos de biodegradación ([Margesin y Schinner 1997](#)).

1.3.1.2.2 FACTORES FÍSICOS

Los factores físicos de mayor importancia en la biorremediación son la biodisponibilidad, la presencia de agua y la provisión de un aceptor de electrones adecuado.

Biodisponibilidad: La tasa de degradación depende tanto de la capacidad de transporte y del metabolismo microbiano, como de la transferencia de masas del compuesto. La relación entre estos factores se conoce como biodisponibilidad. En los suelos uno de los factores limitantes para la biodegradación es la transferencia de masas, ya que los microorganismos de los suelos contaminados, suelen tener amplias capacidades biodegradativas al estar expuestos a una gran variedad de compuestos orgánicos diferentes. Por lo tanto la adsorción, la absorción, desadsorción, disolución y la difusión son fenómenos, propios de la transferencia de masas, que condicionan la biodisponibilidad de los contaminantes ([Bosma et al. 1997](#)).

Un fenómeno que afecta de forma negativa a la biodisponibilidad de los contaminantes es el envejecimiento o aging que se define como la pérdida de la biodegradabilidad de los compuestos a lo largo del tiempo en el suelo (aunque la población microbiana mantenga intacto su potencial catabólico), el cual es más importante en suelos con elevado contenido en materia orgánica ([Nocentini 2000](#)). Este efecto se produce por una serie de fenómenos como son: la adsorción con la materia particulada del suelo, absorción a la materia orgánica del suelo, a la baja difusividad de los compuestos, principalmente desde los microporos; a la disolución en fases líquidas no acuosas (FLNAs), o a la formación de uniones covalentes con la materia orgánica e inorgánica del suelo ([Weissenfels et al. 1990](#); [Alexander 1999](#)).

Presencia de agua: Ésta es necesaria ya que, como se ha visto con anterioridad, los microorganismos toman en carbono orgánico, los nutrientes inorgánicos y los aceptores de electrones, necesarios para el crecimiento microbiano, de la fase líquida. Por lo tanto, el agua debe estar en contacto con los contaminantes en cantidades que permitan el desarrollo de las comunidades microbianas. Sin embargo, el agua puede llegar a inhibir el flujo de aire y reducir el suministro de oxígeno necesario para la respiración microbiana.

1.3.1.2.3 FACTORES QUÍMICOS

Estructura molecular: afecta sus propiedades químicas y físicas; así como, su posibilidad para ser biodegradado. La capacidad para ser biodegradado está relacionada con factores tales como la solubilidad, el grado de ramificación, el grado de saturación y la naturaleza y el efecto de los sustituyentes.

Estructura química: La inherente biodegradabilidad de un hidrocarburo depende, en gran medida, de su estructura molecular. Siendo los parámetros que más van a afectar la halogenación, la existencia de ramificaciones, la baja solubilidad en el agua y la diferente carga atómica. De las distintas familias de hidrocarburos del petróleo, los n-alcenos y los alcanos ramificados (isoprenoides) de cadena intermedia (C₁₀-C₂₀) son los sustratos más fácilmente degradables por los microorganismos del suelo, y que por lo tanto tienden a ser eficazmente biodegradados. Sin embargo, los alcanos de cadena larga (>C₂₀) son más difíciles de degradar debido a su (elevado peso molecular) y su baja solubilidad en agua (Chaineau et al. 1995). Los cicloalcanos, por norma general, se degradan más lentamente que los n-alcenos y alcanos ramificados. De igual forma, los HPA que contienen de 2 a 3 anillos aromáticos pueden ser biodegradados eficazmente en el suelo en condiciones ambientales óptimas, mientras que los HPA de 4 anillos, y especialmente, los de 5 o más anillos bencénicos presentan una mayor recalcitrancia inherente y una baja solubilidad (Kästner 2000). Las fracciones de resinas y asfaltenos son las que presentan una menor degradabilidad debido a las complejas estructuras químicas y al elevado peso molecular de sus moléculas (Pineda y Mesta-Howard 2001).

1.3.1.2.4 FACTORES MICROBIOLÓGICOS

El factor microbiológico más importante en la biorremediación es la transformación biológica de compuestos orgánicos, catalizada por acción de las enzimas. La biodegradación de un compuesto específico es frecuentemente un proceso que se realiza paso a paso en el cual se involucran muchas enzimas y muchos organismos. Las enzimas son específicas en términos de los compuestos que atacan y las reacciones que catalizan. Más de una enzima es normalmente requerida para romper una sustancia orgánica. Frecuentemente, los organismos que tienen las enzimas para degradar están presentes en el suelo.

En la actualidad se conoce una gran variedad de microorganismos capaces de degradar las fracciones más ligeras de los hidrocarburos como son los hidrocarburos alifáticos (HA) y estructuras sencillas de los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) (Leahy y Colwell 1990). En lo que concierne a los HPA de alto peso molecular, la variedad de microorganismos implicados en su degradación es más limitada. Podemos citar especies tales como *Pseudomonas* (*P. putida*, *P. fluorescens*, *P. paucimobilis*, *P. vesicularis*, *P. cepacia*, *P. testosteroni*), *Alcaligenes* (*A. denitrificans*, *A. faecalis*), *Corynebacterium venale*, *Mycobacterium sp.*, *Aeromonas sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Bacillus sp.*, *Moraxella sp.*, *Streptomyces sp.*, *Vibrio sp.*, *Nocardia sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Cyclotrophicus sp.*, etc. Aunque en muchos casos se trata de una biodegradación primaria y no una mineralización completa. (Kanaly y Harayama 2000, Bamfort y Singleton 2005).

La mayor parte de los estudios que involucran la remoción/biodegradación de HPA han sido hechos en un solo compuesto para minimizar el número de variables. Poco es conocido sobre el efecto de mezclas de HPA en la remoción/biodegradación de otro. En la actualidad se conocen algunas rutas metabólicas para la degradación de HPA (Kanaly y Harayama 2000, Van Herwijnen et al. 2003), así como sus metabolitos persistentes a los biotratamientos (Lundstedt 2003).

Las interacciones entre substratos son de interés para las estrategias de biorremediación porque los HPA existen en mezclas complejas en muestras ambientales; así como, en mezclas complejas en hidrocarburos alifáticos, tal como: queroseno, diesel, combustible entre otros. Metabolismo colectivo por un cultivo mixto de microorganismos puede resultar en el mejoramiento de la fracción alifática y aromática, ya que, la biotransformación de productos intermedios de un microorganismo puede servir

como sustrato para el catabolismo y crecimiento de otros. Es difícil estudiar la biodegradación de HPA en ambientes naturales porque un número de factores determinan la velocidad de degradación y la extensión del metabolismo bacteriano. Factores ambientales incluyen temperatura, pH, concentración de oxígeno, salinidad, intensidad de luz, tipo de sedimento, la presencia de co-sustratos y estación del año (Tiehm 1995); así como, la ausencia de inducción enzimática catabólica (Providenti et al. 1993).

Algunas ventajas pueden ser ofrecidas mediante la aplicación de un consorcio/cultivo mixto de microorganismos complejo establecido naturalmente e inespecífico para un contaminante en particular; tal como, aquellos encontrados en lodos activados, abono o composta, los cuales generalmente cargan una alta diversidad de bacterias y hongos junto con una gran variedad de nutrientes esenciales, capaz de mantener la supervivencia y colonización de todos los microbios autóctonos en la muestra inoculada (Dejonghe et al. 2001, Spinelli et al. 2005, Di Toro et al. 2006). Por otro lado, la legislación actual en la restauración de sitios contaminados en algunos países europeos promueve el empleo de algunas de estas fuentes de microorganismos y en particular aquellos obtenidos de la descomposición/estabilización microbiana de “materiales orgánicos de adecuada calidad” de residuos municipales, en la restauración biológica de sitios y suelos contaminados (Italian D.Lgs. No. 152/2006). Por lo tanto, el uso de tales tipos de inóculos para inducir o acelerar la biorremediación de sitios contaminados a través de la liberación accidental de combustibles de depósitos subterráneos o durante su transporte, son de especial interés. Otra forma de obtener un inóculo microbiano indefinido son procedimientos de enriquecimiento con petróleo crudo. La población microbiana en un consorcio indefinido es naturalmente seleccionada por su cooperación metabólica en la degradación de cada mezcla. Consorcios microbianos indefinidos capaces de degradar petróleo crudo serían viables para la bioaumentación de sitios contaminados debido a la estabilidad de sus miembros y amplia actividad de degradación (Ozaki et al. 2006).

Nuestro grupo de trabajo ha desarrollado una tecnología de biorremediación en sustrato sólido basada en la interacción de floras microbianas aportadas por materiales de origen biológico como son el bagacillo de caña, la vermicomposta y el suelo mismo, todo esto adicionado con lombrices de tierra (*Eisenia foetida*) y ácidos húmicos disponibles en el comercio (extracto de leonardita marca Powhumus®). De acuerdo con los resultados obtenidos, la interacción de la flora microbiana aportada

por estos componentes ha permitido remover, en un periodo de 30 días, hasta un 70% de mezclas complejas de HTP en sistemas de sustrato sólido incubados bajo condiciones de humedad controlada (60% de la capacidad de retención de agua del suelo), de una concentración inicial promedio de 83000 mg/kg.

En función de los conocimientos que se tienen en la actualidad sobre los microorganismos implicados en la degradación de HPA, consideramos de utilidad estudiar, los microorganismos capaces de remover HPA que se encuentran presentes en los materiales orgánicos objeto de este estudio, específicamente de aquellos HPA considerados cancerígenos para el ser humano. Se sabe que la eficiencia con que se degradan los hidrocarburos dependerá de la composición, concentración y complejidad de la mezcla de hidrocarburos.

Por tanto propusimos incluir mecanismos alternativos que permitan la transformación de los HPA en moléculas inocuas, como es su inmovilización en las estructuras de los ácidos húmicos. Dicha combinación de mecanismos de degradación e inmovilización permitiría eliminar el impacto de la contaminación ambiental por este tipo de compuestos.

Se propuso seleccionar una flora microbiana hidrocarbonoclasta con alta capacidad para remover hidrocarburos del petróleo considerados carcinogénicos y recalcitrantes, como son los HPA de alto peso molecular. La microbiota hidrocarbonoclasta (MH) con capacidad de remover HPA sería obtenida de los materiales orgánicos: bagacillo de caña, vermicomposta (a base de desechos celulolíticos y excretas de ganado vacuno), extracto de leonardita (Powhumus®) y lombriz de tierra (*Eisenia andrei*). Se seleccionó la flora microbiana que presentó la mayor capacidad para remover HPA de alto peso molecular tales como: acenafteno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, criseno, benzo[a]pireno, dibenzo[a]antraceno, pireno y benzo[a]antraceno. Dicha MH se caracterizó en términos taxonómicos mediante la técnica de electroforesis en gradiente desnaturizante (DGGE), comparación de los patrones de bandas y secuenciación de las mismas; así como, amplificación del gen 16S. En base a la comparación de las bacterias presentes en las diferentes muestras y la eficiencia para degradar HPA de las mismas se trató de encontrar una relación microorganismo/capacidad hidrocarbonoclasta, tratando de identificar las bacterias responsables de la misma.

1.3.2 LAVADO DE SUELO

El lavado del suelo se basan en la eliminación de contaminantes de suelos contaminados por la acción del agua simple o bien ([Griffiths 1995](#)), tensoactivos orgánicos (neutros o iónicos) ([Deshpande et al. 1999](#), [Chu y Chan 2003](#), [Garon et al. 2002](#), [Chun et al. 2002](#), [Kalali et al. 2011](#), [Peng y Chen 2011](#)) o biotensoactivos ([Noordman et al. 2000](#), [Mata-Sandoval et al., 2002](#)).

Una de las principales limitaciones para la degradación de HPA de mayor número de anillos es su biodisponibilidad ([Shiaris 1989](#), [Sehlin 2004](#)). Esta se ha asociado a fenómenos de adsorción a las partículas de suelo así como a su muy baja solubilidad (o insolubilidad) en medio acuoso (hidrofobicidad) del orden de 0.016 g/l (acenaftileno → 2 anillos aromáticos) hasta 7×10^{-10} g/l (benzo[a]pireno → 5 anillos aromáticos). Se admite que sólo la fracción soluble de un contaminante está biodisponible y, por tanto, puede ser metabolizada.

1.3.2.1 Uso de SH en procesos de remoción de hidrocarburos

Entre los agentes tensoactivos que se han desarrollado y empleado para lavar los suelos y, por mucho, las mayores clases de tensoactivos de uso general hoy en día son los tensoactivos aniónicos, que constituyen aproximadamente del 70 al 75% del consumo total de tensoactivos ([Myers 1988](#)). Surfactantes sintéticos con frecuencia han sido propuestos para tales fines pero fueron encontrados a ser persistentes y tóxicos en el suelo tratado. Por otra parte, pocos esfuerzos se han hecho para mejorar sus prestaciones y para investigar la posibilidad de utilizar agentes tensoactivos ambientalmente compatibles en lugar de surfactantes químicos. Tensoactivos biológicos como la lecitina de soja o de ramnolípidos se han empleado ([Fava et al. 2004](#), [Berselli et al. 2004](#)). El uso de tensoactivos de origen biológico ha demostrado favorecer la desorción de hidrocarburos aromáticos y alifáticos, así como, para evitar impartir toxicidad al suelo. Sin embargo, la obtención de estos tensoactivos puede ser lenta, complicada y costosa. Una alternativa a la desorción de los hidrocarburos es el uso de ácido húmico (AH), como lo demostró [Conte et al. \(2005\)](#).

Los ácidos húmicos son un grupo de estructuras supramoleculares conocidos como sustancias húmicas (SH). Las SH se generan a partir de un proceso conocido como humificación, que es el proceso químico-microbiológico de la transformación de los residuos de los organismos vivos en una clase general de compuestos orgánicos refractarios. Las sustancias húmicas (SH) son materiales orgánicos naturales ubicuos en aguas, sedimentos y suelos.

En los suelos, las SH controlan el destino de los contaminantes ambientales, estabilizar la estructura de los agregados, y afectan a la biogeoquímica del carbono orgánico. A pesar de la importancia de SH en fomentar la biodiversidad, afectar la calidad del agua, y el mantenimiento de la producción de los alimentos, la comprensión de su naturaleza química básica y reactividad sólo se ha logrado recientemente ([Tan 2003](#)).

Se ha demostrado que las SH poseen propiedades de intercambio iónico, quelantes, transformaciones redox, enlace hidrófobo, etc. Estas propiedades han sido utilizados para acelerar o mejorar los procesos de biorremediación o la eliminación de sustancias tóxicas diferentes como: colorantes, hidrocarburos, pesticidas, entre otros ([Piccolo 1996](#), [Tan 2003](#)). Entre las propiedades fisicoquímicas de las SH, podemos destacar sus propiedades tensoactivas, que han sido descritas, en principio, por [Oden \(1919\)](#), [Tsctapek et al. \(1981\)](#), [Wershaw \(1989\)](#) y más tarde por [Kleber et al. \(2007\)](#), todos ellos tratan de explicar las propiedades tensoactivas, así como, su interacción contra moléculas hidrófobas y partículas de suelo. Ellos describen a las SH como una mezcla de pequeñas piezas anfífilas unidas entre sí por fuerzas débiles tales como Van der Waals, π - π , π -CH, etc. Las sustancias húmicas, considerados como surfactantes naturales, comienzan a ser reconocidos como una posible ayuda de las técnicas de bioremediación de suelos. La biodisponibilidad de los HPA ([Holman et al. 2002](#)) parece ser mayor por la adición exógena de sustancias húmicas en suelos contaminados. Además, se ha encontrado que la actividad surfactante de las SH reduce la absorción de contaminantes orgánicos en los suelos contaminados, lo que permite la desorción-remediación de los HPA ([Janzen 1996](#), [Chafetz et al. 2000](#), [Conte et al. 2001](#), [Holman et al. 2002](#)). La biodisponibilidad de los hidrocarburos ([Holman et al. 2002](#)) se ha visto incrementada mediante la adición exógena de SH en suelos contaminados. La actividad de las sustancias húmicas como tensoactivo puede ser útil en la reducción de la absorción de contaminantes orgánicos en suelos contaminados, lo que permite la desorción-remediación de los hidrocarburos ([Jansen 1996](#), [Chafetz et al. 2000](#), [Piccolo et al. 2001](#), [Holman et](#)

al. 2002). La importancia de promover el uso de las ambientalmente seguras sustancias húmicas en la remediación de suelos altamente contaminados deben ser evidentes. Las sustancias húmicas pueden incluso mejorar la actividad de la biomasa en suelos lavados y contribuir a la atenuación natural una vez que el suelo ha sido tratado después de un proceso de recuperación ex situ (**Fava y Piccolo 2002; Marschner y Kalbitz 2003**). Por otra parte, la fracción de las sustancias húmicas restantes en el suelo pueden tener una acción favorable en el crecimiento de las plantas y contribuir así a la plena recuperación de los suelos tratados (**Nardi et al. 2002**).

Conte et al. (2005), realizaron lavados de suelo contaminado con HTP encontrando que todos los surfactantes (ácido húmico, SDS, TX100 adicionados en una relación 1:10 (suelo/solución) en base a su CMC → Concentración Micelar Crítica, 24 horas, 100 rev/min) revelaron eficiencias de remoción muy similares (hasta un 90%: HPA, Halogenados monoaromáticos, tiofenos, bifenilos, entre otros) en la eliminación de los contaminantes en los suelos analizados de entre 4500 y 1500 mgHTP/kg.

Kalali et al. (2011) emplearon la metodología de superficie de respuesta con el fin de determinar las condiciones óptimas para la remoción de hidrocarburos totales de petróleo utilizando tensoactivo no iónico Brij35 en un suelo contaminado con 50000 mg/kg. El efecto de diferentes factores en el proceso de lavado del suelo incluyendo la concentración de surfactante solución y el volumen, el tiempo de lavado, el tiempo de contaminación (días) y la frecuencia de lavado fueron evaluados. La concentración óptima (8 g/l), el volumen de la solución de surfactante (500 ml), el tiempo de lavado (75 min), el tiempo de contaminación (29 días) y la frecuencia de lavado (tres veces), permitieron remover un 93.54% de los HTP.

Sheng et al. (2011) estudiaron la remoción de HPA realizando lavado de suelo empleando surfactantes (TW80 y TX100) a través de una serie de pruebas de laboratorio para examinar el efecto de la velocidad de agitación, el tiempo de lavado, concentración de surfactante, relación líquido / sólido, la temperatura y en modo con / sin agitación. Los primeros cuatro factores mostraron una influencia significativa sobre la eliminación, mientras que los dos últimos no. Las mejores condiciones de remoción se obtuvieron con una relación, líquido/sólido → 10:1, una agitación a 250 rev/min y 60 min. Soluciones que empleen SH, pueden convertirse en una alternativa válida y relativamente barata en comparación con los métodos comunes de recuperación de los suelos.

1.4 MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LAS SH

La génesis de las SH y por lo tanto la fuente de ellas proceden de los residuos de los organismos vivos, aunque un proceso complejo en cualquier tipo de suelo (especialmente agrícolas), compost (SH juvenes, menor grado de oxidación) o material antropogénico como leonardita (SH maduras, con mayor grado de oxidación).

La leonardita es un tipo de carbón suave generalmente encontrado en conjunción con depósitos de lignito y es la materia prima más ampliamente utilizada para la producción de preparados húmicos comerciales. Por lo tanto, el uso de SH derivadas de leonardita ampliamente justifica su uso en las tareas de desintoxicación de suelos contaminados.

Sin embargo, las SH tienen limitaciones naturales ya que son moléculas heterogéneas, esta limitación puede ser reducida teniendo en cuenta que las SH derivadas de leonardita y de una región geográfica fija no exhibirán grandes cambios a corto plazo estructurales, por lo que es posible caracterizar la molécula. [Almendros \(1995\)](#), [Ilyukhina et al. \(2005\)](#), [Perminova et al. \(2005\)](#), [Perminova et al. \(2006\)](#) han hecho modificaciones químicas a los AH con el fin de cambiar o aumentar sus propiedades en contra de plaguicidas o mejorar sus propiedades redox; sin embargo, casi no hay reportes de su modificación química y ninguna para favorecer sus propiedades tensoactivas. A pesar del potencial de las SH como tensoactivos; existen limitaciones debido al tipo y complejidad de los hidrocarburos en la mezcla a tratar. La presencia de un alto contenido de fracción asfáltica en la mezcla de hidrocarburos disminuye la eficiencia a la dispersión por las SH. Así, la introducción de otras cadenas de alquilo podría mejorar la afinidad entre las sustancias húmicas y los hidrocarburos totales de petróleo (TPH). La O-alquilación de los AH con cadena corta y haluros de bencilo en reacciones convencionales también se han descrito ([Piccolo 2006](#)).

Las investigaciones demostraron la factibilidad de mejorar las propiedades originales de los ácidos húmicos y obtener un producto con propiedades a medida. Estudios realizados por nuestro equipo (datos no mostrados) nos permitieron observar limitada desorción de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) por las SH, que se ve reflejado en un mayor contenido de la fracción asfáltica y por lo tanto en el incremento de estructuras hidrofóbicas complejas. Sin embargo, las fracciones de hidrocarburos "ligeros", es decir, con menos contenido de asfaltenos o en ausencia de éstos, la desorción /

solubilización (D / S) se ve facilitada. La baja eficiencia de la D / S es mayor con la HPA. Es por eso que una alternativa es integrar grupos aromáticos o alifáticos a las SH con el fin de aumentar su afinidad por moléculas aromáticas al mismo tiempo que mantener su solubilidad con el fin de utilizarlas en los procesos de lavado.

Los recientes resultados cromatográficos y espectroscópicos han demostrado que las SH son asociaciones supramoleculares de pequeño tamaño (<1000 Da) moléculas heterogéneas unidas principalmente por fuerzas débiles. Numerosas técnicas químicas se han utilizado tradicionalmente para modificar la disposición estructural de las sustancias húmicas y obtener información sobre su composición molecular, como lo es la metilación de la molécula. Recientemente se han realizado estudios sobre la modificación química de su estructura con la finalidad de incrementar sus propiedades quelantes sobre metales pesados y su interacción con HPA.

Sin embargo, no hay reportes sobre la modificación de sus propiedades tenso depresivas, lo cual puede contribuir al entendimiento de este fenómeno al determinar cuáles grupos funcionales están implicados y como se puede favorecer la posible génesis de SH a partir de las materias primas (en particular de origen vegetal) que originan su formación o aislar SH de zonas geográficas en donde se favorezca la génesis de SH con propiedades deseadas.

Es por ello que resulta de interés analizar la estructura de las SH orientada al entendimiento de la estructura en su capacidad tensodepresiva para poder implementar una estrategia de modificación estructural mediante reacciones orgánicas que no alteren en gran medida la estructura original de la molécula ya sea empleando calentamiento convencional; es decir, calentamiento directo a la flama o a una resistencia o el uso alternativo de microondas. En el presente proyecto se ha considerado la activación de los ácidos húmicos, mediante reacciones químicas (esterificación o eterificación) con la finalidad de incrementar sus propiedades tensoactivas y permitir incrementar su interacción con los HPA en procesos de lavado.

2 JUSTIFICACIÓN

La remoción de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) intemperizados de suelos reales contaminados, es una prioridad mundial debido a su efecto tóxico sobre los seres vivos, es por esta razón que es de interés desarrollar tecnologías de remediación efectivas y económicamente viables. Las tecnologías de biorremediación han demostrado ser eficientes y económicas; sin embargo, pueden ser lentas y poco eficientes en la remoción de las fracciones más recalcitrantes de los HTP como son los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA). Entre las principales limitaciones se encuentran la diversidad de microorganismos hidrocarbonoclastas, la ausencia de nutrientes y la disponibilidad de los hidrocarburos. La remoción de estos hidrocarburos se puede llevar a cabo por procesos de co-metabolismo, donde participen microorganismos característicos de la transformación de moléculas aromáticas como la lignina presente en residuos como el bagacillo de caña, olote, aserrín, vermicomposta e incluso los microorganismos asociados a la flora intestinal de la lombriz compostera. Dada la amplia variedad de enmiendas naturales empleadas en los procesos de biorremediación en biopilas, es de interés conocer los microorganismos adjuntos a estos y el impacto que tienen en los procesos de remoción de hidrocarburos. La desorción de hidrocarburos de las partículas de suelo ha sido comúnmente realizada a base de tensoactivos sintéticos. Aunque, materiales tensoactivos de origen orgánico, tales como los ácidos húmicos, son una opción interesante. En lo que concierne a los ácidos húmicos, moléculas complejas que evolucionan en el curso del tiempo, existen reportes científicos acerca de su poder tensoactivo y capacidad para incorporar estructuras aromáticas en su molécula.

En el presente trabajo se propone evaluar el efecto de la presencia de un cultivo mixto hidrocarbonoclasta especializado en la remoción de HTP e HPA, aislada de los materiales orgánicos vermicomposta, bagacillo de caña, lombriz (*Eisenia andre*) y extracto de leonardita presentes en un preparado líquido suplementado de sustancias húmicas y nutrientes.

3 HIPÓTESIS

- Si la capacidad de los microorganismos para metabolizar hidrocarburos aromáticos y alifáticos, esta asociada a la estructura compleja y rica en moléculas aromáticas del material orgánico del cual se aíslan, entonces el bagacillo de caña, la vermicomposta y los ácidos húmicos, poseerán este tipo de microorganismos.
- Dado que la capacidad de remoción de hidrocarburos aromáticos y alifáticos en suelo, esta asociada a los grupos funcionales de las sustancias húmicas, entonces su modificación química permitirá incrementar la remoción respecto a la molécula nativa.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Caracterizar un cultivo mixto hidrocarbonoclasta aislado de los materiales orgánicos: bagacillo de caña, vermicomposta, extracto de leonardita y lombriz; y evaluar su capacidad para remover hidrocarburos totales del petróleo e hidrocarburos policíclicos aromáticos de un suelo contaminado, en presencia/ausencia de sustancias húmicas.

4.2 Objetivos específicos

- Aislar e identificar por técnicas de microbiología tradicional, los microorganismos hidrocarbonoclastas de los cuatro materiales orgánicos objeto de estudio.
- Evaluar la capacidad de remoción de HPA en presencia de queroseno por las microbiotas y cultivos mixtos aislados de los cuatro materiales orgánicos objeto de estudio.
- Identificar por técnicas de biología molecular a los integrantes del cultivo mixto cuya remoción de HPA sea la mayor.
- Evaluar la capacidad de remover HPA, como única fuente de carbono, por el cultivo mixto seleccionado.
- Discutir la eficiencia de remoción de HTP e HPA por el cultivo mixto hidrocarbonoclasta seleccionado y un cultivo mixto comercial bacteriano en presencia/ausencia de sustancias húmicas y nutrientes **
- Modificar químicamente las sustancias húmicas, orientado a la incorporación de grupos reactivos (aromáticos o alifáticos), para incrementar sus propiedades anfipáticas.
- Evaluar la capacidad de remover HTP e HPA mediante lavados de suelo empleando las sustancias húmicas modificadas de suelos contaminados.

*** La evaluación de la remoción de HTP e HPA por el cultivo mixto y el cultivo mixto comercial, fué evaluada por las Ingenieras en Biotecnología, Leslie Adriana Ríos Rodríguez y Remedios González Garduño como tesis de licenciatura por la Universidad Tecnológica de Tecamac.*

5 MATERIALES

5.1 Bagacillo de caña (BC)

Producto de desecho de un procesadora de hojas de papel (Kimberly-Clarck) del estado de Veracruz, previamente composteada. El bagacillo de caña fue homogenizado y triturado para su caracterización.

5.2 Lombriz (L)

Eisenia andrei con clitelio, proporcionada por el Dr. Ronald Ferrera Cerrato del Colegio de Postgraduados del Programa de Postgrado en Edafología.

5.3 Vermicomposta (VC)

Producto de la digestión de paja y estiércol bovino (previamente composteados) por la lombriz *Eisenia andrei*. La VC fue proporcionada por el módulo de vermicompostaje del Área de Microbiología del Colegio de Postgraduados del Departamento de Edafología. La vermicomposta fue homogenizada y cribada en malla 10 para su caracterización.

5.4 Extracto de Leonardita (EL)

Se empleó el producto comercial Humintech® Powhumus® del cual se aislaron los microorganismos hidrocarbonoclastas. Este producto es un acondicionador natural del suelo y bioestimulante de las plantas que contiene sustancias húmicas extraídas de leonardita mediante solución alcalina (NaOH). Así mismo, se emplearon ácidos húmicos y fúlvicos extraídos también de leonardita, suministrados por la empresa mexicana TEMA (Tecnología Especializada en el Medio Ambiente, S.A. de C.V) para realizar los ensayos de modificación química. Los ácidos fúlvicos no requirieron purificación alguna, debido a que se trabajó con un producto puro.

5.5 Suelos

a) *Suelo empleado para evaluar el efecto de la incorporación de un cultivo mixto hidrocarbonoclasta y sustancias húmicas en la remoción de HTP e HPA*

Se utilizó un suelo limpio proveniente del campo 10 perteneciente a la petroquímica Escolin, ubicada en el municipio de Poza Rica, Veracruz. El suelo seco fue homogenizado y cribado en malla 25 para su caracterización. Las características fisicoquímicas fueron: pH, 7.95 ± 0.05 ; capacidad de retención de agua, $43 \pm 3\%$ (v/p); carbono orgánico $2.3 \pm 0.5\%$ (p/p); fósforo disponible $1.6 \pm 0.004\%$ (p/p); nitrógeno total $0.13 \pm 0.01\%$ (p/p), los análisis fueron realizados de acuerdo con Alefa et al. (1995). El contenido de AF y AH fue de $1.42 \pm 0.03\%$ (p/p) y $0.23 \pm 0.05\%$ (p/p) de acuerdo con el método establecido por la IHSS.

b) *Suelo empleado para evaluar la remoción de HTP mediante sustancias húmicas modificadas*

Se utilizó un suelo intemperizado contaminado con aceite crudo proveniente del mismo campo 10. Las características fisicoquímicas fueron las mismas que el suelo anterior pero el contenido de carbono fue de $7 \pm 0.5\%$ (p/p) debido al contenido de hidrocarburo.

c) *Suelo empleado para evaluar la remoción de HPA mediante los ácidos húmicos modificados*

Dos muestras de suelo limpio con diferente textura fueron utilizadas. El suelo seco fue homogenizado y cribado en malla 25 para determinar su textura ([Tabla 3](#)).

Tabla 3. Textura de los suelos empleados en la evaluación de los ácidos húmicos modificados en la remoción de HPA

	A	B
Arena (%)	50.1 ± 0.8	36.6 ± 0.5
Limo (%)	23.2 ± 0.5	33.75 ± 0.8
Arcilla (%)	26.7 ± 0.2	29.65 ± 0.2
Textura*	Franco-areno-arcilloso	Franco-arcilloso

*De acuerdo a los gráficos para denominar los suelos según su textura.

5.6 Reactivos para la evaluación de la remoción HPA

Los HPAs empleados fueron acenaftileno (Antl), acenafteno (Anth), fenantreno (Phe), antraceno (Ant), fluoranteno (Flu), criseno (Cry), pireno (Pyr) y benzo[a]pireno (BaP); se adquirieron de Sigma-Aldrich (México). El queroseno empleado en este trabajo fue adquirido de J. T. Baker (USA).

5.7 Reactivos para la modificación química de las sustancias húmicas y lavado de suelos

Ácido metanosulfónico (MsOH), 1-octanol, 1-decanol, 1-dodecanol, Aliquat 336, hidróxido de tetrabutilamonio ($\text{Bu}_4\text{N}^+\text{OH}^-$ or HTBA, 40% en H_2O), tetrahidrofuran (THF), bromuro de n-octilo, bromuro de n-tetradecilo, bromuro de n-octadecilo, yoduro de metilo, bromuro de pentilo y bromuro de bencilo fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Milán, Italia) los cuales se emplearon sin purificación adicional. Las soluciones utilizadas para los lavados de suelo fueron: 1. agua MilliQ. 2. Dodecilsulfato de sodio (SDS); 3. Tritón X-100 (TX100); 4. AH (ácido húmico sin modificación química); 5. AH-bencilado; 6. AH-pentilado; 7. AH-metilado. Los surfactantes SDS y Tritón X-100 se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Milan, Italia). Los HPAs empleados fueron: fenantreno (Phe), antraceno (Ant), fluoranteno (Flu) y pireno (Pyr); los cuales se adquirieron de Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI).

6 MÉTODOS

6.1 Estrategia Experimental

La estrategia experimental estuvo dividida en cuatro etapas, como se indica en la **Figura 1**. La primera etapa contempló el aislamiento de los miembros de la microbiota hidrocarbonoclasta de cada material orgánico objeto de estudio; así como, el estudio de la capacidad para remover HPA (en presencia/ausencia de queroseno) mediante la obtención de diversos inóculos (microbiotas totales, microbiotas bioestimuladas y/o cultivos mixtos obtenidos de cada material orgánico) y sus mezclas; para finalmente seleccionar el inóculo cuyo nivel de remoción de HPA fue el mejor. La segunda etapa consistió en identificar por técnicas de biología molecular a los integrantes del inóculo para asignar género y especie. Así mismo se estudió la evolución de los integrantes del inóculo en el proceso de remoción de HPA (como única fuente de carbono) empleando la técnica de biología molecular DGGE (electroforesis en gel con gradiente desnaturizante) y cuenta total en placa. En la tercera etapa se validó la eficiencia de remoción de HTP e HPA de un suelo real contaminado en presencia/ausencia de sustancias húmicas, por el inóculo seleccionado de la etapa dos. Finalmente la etapa cuatro tuvo la finalidad de modificar químicamente sustancias húmicas incorporando grupos reactivos, con la finalidad de incrementar su capacidad anfipática y su efecto en la desorción de HTP e HPA, para lo cual se diseñó una estrategia de lavado de suelo real contaminado intemperizado o artificialmente contaminado con HTP y/o HPA.

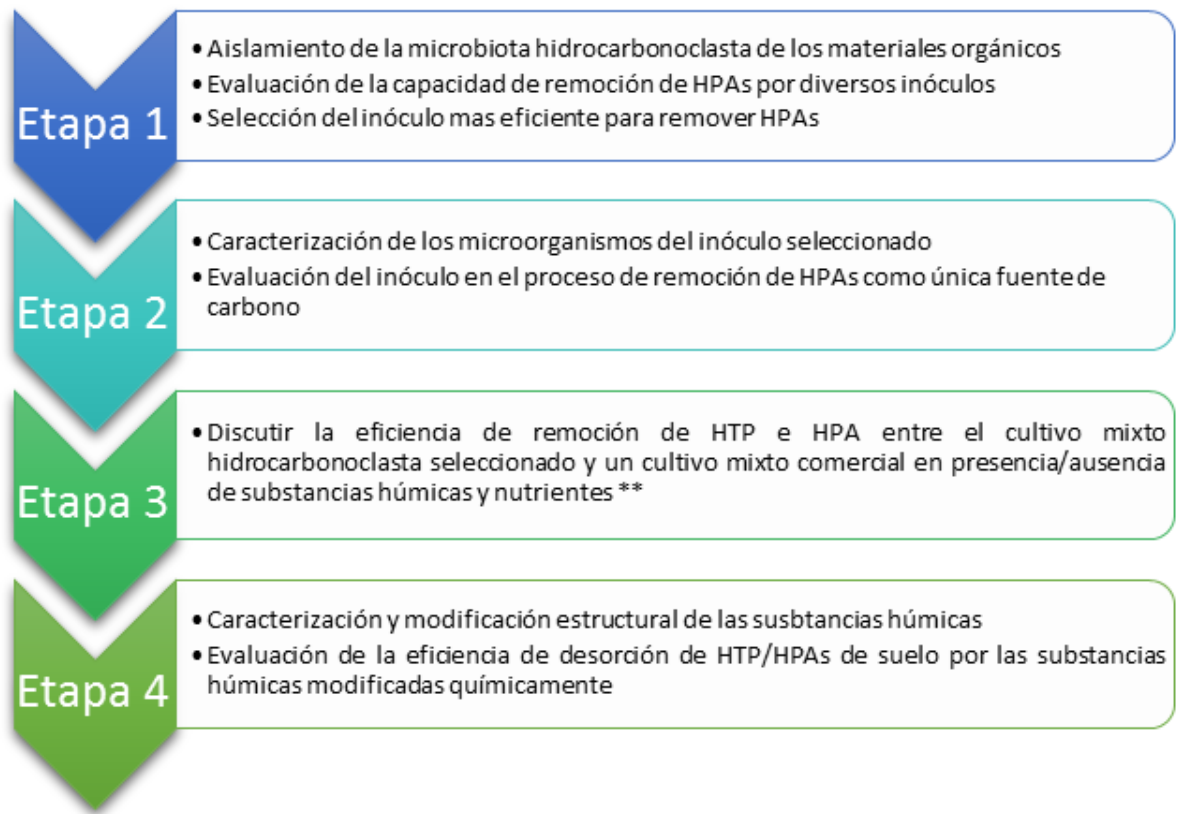


Figura 1. Estrategia experimental para la remoción de HPA de suelos reales contaminados.

** Análisis llevado a cabo a partir de los resultados obtenidos por las Ingenieras Bioquímicas Leslie Adriana Ríos Rodríguez y Remedios González Garduño de la Universidad Tecnológica de Tecamac.

6.1.1 Etapa 1

6.1.1.1 Cuenta total de los microorganismos heterótrofos aerobios e hidrocarbonoclastas

Se realizaron diluciones seriales de lombriz (estas fueron lavadas con agua estéril, secadas en papel filtro estéril, pesadas y finalmente fueron molidas bajo condiciones estériles), bagacillo de caña, vermicomposta y extracto de leonardita (1×10^{-1} a 1×10^{-9}) a partir de 1 gramo de muestra. Una muestra de 100 μ l de cada dilución fue distribuida en cajas Petri previamente preparadas con agar medio mineral con o sin una atmosfera de queroseno (se impregnó un papel filtro de 4 x 2 cm con 0.5 ml de queroseno y se colocó en la tapa superior de la caja Petri). El agar medio mineral (1 l) consistió de dos soluciones; solución A (0.9 l): K_2HPO_4 (0.8g), KH_2PO_4 (0.2g), KCl (0.1g), $Na_2FeEDTA$ (0.014g), $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (0.025g), NH_4NO_3 (1g) y Agar-Agar (15g) y la solución B (0.1 l): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.2g) y $CaCl_2$ (0.06g) (Renie, 1981; modificado por R. Ferrera-Cerrato). Ambas soluciones, previamente preparadas y ajustadas a pH 7, fueron esterilizadas por separado a 121 °C por 18 min, antes de ser mezcladas bajo condiciones de esterilidad; por último se adicionó biotina (co-factor enzimático) y ácido p-aminobenzoico (10 mg/l) (factor de crecimiento). La cuenta total de heterótrofos fue determinada por la dispersión de alícuotas (0.1 ml) en las mismas diluciones en agar nutritivo o Sabouraud. Las cajas Petri fueron incubadas a 32 °C durante 7 días (microorganismos heterótrofos aerobios) hasta 15 días (microorganismos hidrocarbonoclastas), realizando la cuenta total después de éste periodo (30 – 300 colonias por caja).

6.1.1.2 Aislamiento de microorganismos hidrocarbonoclastas de los materiales orgánicos

Un gramo de cada material orgánico fue suspendido en 19 ml de agua destilada estéril (dilución 1:20 p/v; establecido en base a la capacidad de retención de agua por el BC) contenida en viales de 50 ml (en el caso de la lombriz, estas fueron lavadas con agua estéril, secadas en papel filtro estéril, pesadas

y finalmente fueron molidas bajo condiciones estériles). Los viales fueron agitados por 20 minutos y se les permitió reposar hasta la sedimentación de sólidos. Después, 1 ml de cada suspensión fue adicionado por cuadruplicado en viales de 100 ml que contenían 25 ml de medio mineral (el mismo que el descrito anteriormente pero si agar-agar) y 5000 mg/l de queroseno como fuente de carbono. Los viales fueron incubados por 30 días a 30 °C y 170 rev/min para el crecimiento microbiano. Al final de este periodo los viales presentaron un notable crecimiento (agregados y diversos colores). Los viales fueron agitados y homogenizados en la medida de lo posible para después tomar alícuotas de 0.1 ml de cada vial las cuales fueron dispersadas en agar nutritivo o Sabouraud (incubadas a 30 °C por 30 días) con la finalidad de estimular el crecimiento de las bacterias y los hongos que sobrevivieron bajo la presencia de hidrocarburos. Basado en la morfología colonial como el tamaño, forma, color, bordes, textura y Gram, las diferentes colonias fueron estriadas y/o picadas (hongos) una vez más en agar nutritivo o Sabouraud para su identificación. Estos aislados pre-seleccionados fueron repetidamente estriados en placas con agar hasta la obtención de cepas puras. Con propósitos de re-confirmar la capacidad de usar hidrocarburos como fuente de carbono, estas cepas fueron estriadas en agar medio mineral con o sin atmósfera de queroseno como única fuente de carbono.

Con la finalidad de conocer cuántos de estos microorganismos podrían crecer en presencia de HPA objeto de estudio (acenaftileno, acenafteno, fenantreno, antraceno, pireno, criseno y benzo[a]pireno); un análisis de tolerancia fue desarrollado. Un mililitro de una solución de HPA (100 mg/l de cada uno, diluido en diclorometano) fue asperjado en el centro de una caja petri con agar medio mineral hasta que la solución se evaporó. Después, cada microorganismo aislado fue estriado del centro de la caja hacia la periferia e incubado bajo atmosfera de queroseno a 30 °C por 30 días.

6.1.1.3 Cinéticas de crecimiento de los microorganismos aislados

Cada microorganismo aislado fue inoculado en 30 ml de caldo nutritivo, incubado a 30 °C y 150 rev/min hasta alcanzar una densidad óptica (D.O). de 0.5 medida a 660nm (Thermo Spectronic, Genesys 10UV). Después las cepas fueron inoculadas (3 ml) en caldo nutritivo fresco (27 ml) y agitado a 150

rev/min y 30 °C. La concentración celular de cada microorganismo fue determinada por D.O. (por triplicado) de muestras tomadas periódicamente.

6.1.1.4 Evaluación de la capacidad de remoción de HPA por diversos inóculos y sus mezclas

6.1.1.4.1 Preparación de inóculos de cada material orgánico

a) *Microbiota total (MT)*

Un gramo de cada material orgánico fue suspendido en 19 ml de *agua destilada estéril* (dilución 1:20) contenida en viales de 50 ml (en el caso de la lombriz, estas fueron lavadas con agua estéril, secadas en papel filtro estéril, pesadas y finalmente fueron molidas bajo condiciones estériles). Los viales fueron agitados por 20 minutos posteriormente se les permitió reposar hasta la sedimentación de sólidos y filtrados a través de papel Whatman No. 1 estéril.

b) *Microbiota bioestimulada total (MBT)*

Un gramo de cada material orgánico fue suspendido en 19 ml *caldo nutritivo* (dilución 1:20) contenida en viales de 50 ml (en el caso de la lombriz, estas fueron lavadas con agua estéril, secadas en papel filtro estéril, pesadas y finalmente fueron molidas bajo condiciones estériles). Los viales fueron agitados por 24 horas a 37 °C y 170 rev/min, finalmente se les permitió reposar hasta la sedimentación de sólidos y filtrados a través de papel Whatman No. 1 estéril.

c) *Cultivo mixto (CM)*

Los microorganismos aislados (6.1.1.2) se crecieron en forma axénica en 50 ml de *caldo nutritivo* a 30 °C y 150 rev/min hasta alcanzar una D.O. de 0.5, la cual fue medida a 660nm. Después, 10% de este cultivo fue inoculado en 50 ml de *caldo nutritivo* fresco e incubado (30 °C y 150 rev/min) hasta que cada microorganismo creció a la mitad de su fase logarítmica de crecimiento (aprox. 8 h). A continuación, el material celular fue recuperado por centrifugación a 8000 rev/min por 5 min. Los pellets fueron lavados dos veces por agitación con 30 ml en agua estéril isotónica (0.85% NaCl) y centrifugados (8000 rev/min por 5 min). Finalmente todos los microorganismos que pertenecen a

un material orgánico específico en forma de pellet (L, VC, BC o EL) fueron puestos juntos y re-suspendidos en 50 ml (4×10^7 bacterias/ml) de medio mineral con la finalidad de obtener un cultivo mixto de cada material (cuatro cultivos mixtos).

d) Cultivo mixto comercial (CMC)

Se utilizó el producto comercial p-Bio TPH/D de la empresa SilmanCare. P-Bio es una mezcla patentada de bacterias culturas híbridas, específicamente diseñado para degradar las fracciones de petróleo conocidas como alifáticas, aromáticas, aceites combustibles, etc. Cien gramos de p-Bio TPH/D se añadió en un galón de agua destilada estéril. A continuación, el agente de bioaumentación se mezcló y agitó durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir que los ingredientes activos se liberaran; así como, permitir la activación microbiana. Por último, el producto hidratado se filtró a través de un tamiz de tela o un paño, para eliminar los sólidos más grandes.

6.1.1.4.2 Remoción de HPA en presencia de queroseno por los inóculos

Un mililitro de cada inóculo (**a**, **b** o **c**) que pertenece a un material orgánico fue adicionado en un vial de 100 ml y se completó a un volumen final de 50 ml con medio mineral. Un diseño experimental combinatorio sin repetición fue empleado para determinar el nivel de remoción por los distintos inóculos y sus mezclas como se muestra en la **Tabla 4**. Como fuente de carbono a cada vial se le adicionó 5000 mg/l de Queroseno y 100 mg/l de cada HPA (acenaftileno, acenafteno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, criseno, pireno y benzo[a]pireno), los ensayos fueron realizados por triplicado. Después de la incubación por un mes en la oscuridad a 150 rev/min y 30 °C, los sistemas fueron analizados para determinar HPAs residuales y crecimiento microbiano (dilución serial y dispersión en placa). Solo un tratamiento fue seleccionado de acuerdo al mayor porcentaje y número de HPAs removidos. Como control un medio sin inóculo fue usado.

Tabla 4. Mezclas de las MH de los materiales orgánicos (en 55 ml) de los tratamientos

	AH	L	VC	BC	MM
1	▲	▲	▲	▲	46 ml
2	▲				49 ml
3		▲			49 ml
4			▲		49 ml
5				▲	49 ml
6	▲	▲			48 ml
7	▲	▲	▲		47 ml
8	▲		▲		48 ml
9	▲			▲	48 ml
10	▲		▲	▲	47 ml
11	▲	▲		▲	47 ml
12		▲	▲		48 ml
13		▲	▲	▲	47 ml
14		▲		▲	48 ml
15			▲	▲	48 ml
Blanco 1					50 ml
Blanco 2					50 ml
Blanco 3	▲				50 ml
Blanco 4	▲				50 ml

AH: ácido húmico; L: Lombriz; VC: Vermicomposta; BC: Bagacillo de caña; MM: Medio Mineral; B1: Blanco para analizar al día cero; B2: blanco para analizar al termino del tratamiento; B3: blanco con ácidos húmicos esterilizados para analizar al día cero; B4: blanco con ácidos húmicos esterilizados para analizar al termino del tratamiento.

6.1.1.4.3 Análisis de remoción de HPA

Los HPA fueron extraídos del medio de cultivo mediante extracción líquido-líquido empleando diclorometano (tres extracciones con 20mL), recuperándolo del fondo del vial mediante una pipeta aforada de vidrio de 10ml de graduación ayudándose de una propipeta. El disolvente fué evaporado con una corriente de nitrógeno hasta completa evaporación. Posteriormente se adicionaron 5mL de hexano para disolver los HPA residuales. Finalmente 1 µl de muestra (de cada sistema) fue analizado por cromatografía de gases con un detector de ionización de flama (FID) (Perkin Elmer Auto System) y una columna capilar Sil 8 CB (Varian) de 25 m, diámetro interno 0.32 mm y 0.4 µm de grosor de la

capa; nitrógeno fue el gas acarreador a 7.7 psi. La temperaturas del inyector y del detector fueron ajustados a 250 y 280 °C, respectivamente. La temperatura del horno fue incrementada en una etapa: de 170 °C, con un tiempo de retención de 17 min, a 300 °C a 18 °C por minuto con un tiempo de retención final de 9 min (tiempo total: 33.2 min).

El área de los picos de estándares de HPA fueron usados para cuantificar los HPA residuales en las muestras, en comparación con el control el cual tuvo la concentración inicial de HPA ([Boonchan et al. 2000](#)).

6.1.1.4.4 Análisis estadísticos

Los tratamientos se analizaron mediante el programa NCSS 2007, empleando prueba de comparaciones múltiples de Duncan, Fisher (LSD) y Tukey-Kramer ($P < 0,05$).

6.1.2 Etapa 2

6.1.2.1 Identificación de los microorganismos

Los microorganismos fueron identificados por técnicas de biología molecular, para ello se procedió a realizar la extracción del DNA genómico y la posterior amplificación del gen 16S rDNA.

6.1.2.1.1 Extracción de DNA y PCR

Este análisis fue hecho solo para los microorganismos que pertenecieron al mejor tratamiento que removió los HPAs en presencia de queroseno. El DNA genómico fue extraído de las cepas crecidas en medio nutritivo al final de su fase logarítmica. Las células fueron recuperadas por centrifugación (10000 rev/min por 5 min) y suspendido en 20 µl de buffer TE (100 mM Tris•Cl, pH 8.0, 10 mM EDTA) conteniendo 1% de Tritón X-100 (24 µl Tritón X-100 al 10%), 56 µl de agua estéril y 100 µl de solución de lisozima (40 mg/ml lisozima, 40 mM Tris•Cl, pH 8.0). La suspensión fue sujeta a tres ciclos de congelamiento/descongelamiento; cada ciclo consistió en 5 min de congelamiento en hielo seco/acetona, 5 min de descongelamiento a 65 °C en un baño de agua con una ligera agitación, finalmente una agitación en vortex (MS2 Minishaker; IKA Labortechnik, Stauffen, Germany) a máxima velocidad por 10 s. La suspensión fue primero incubada por 30 min y 65 °C mezclando por inversión cada 10 min. Después 3 µl de una solución de proteinasa K (20 mg/ml proteinasa K, 50 mM Tris, pH 8.0 y 1.5 mM de acetato de calcio), 30 µl de SDS 10% (v/v), 367 µl de buffer TE y 6 µl de RNAsa (5 mg/ml) fueron adicionadas. A continuación, se incubó la mezcla por 2 h a 37 °C en un baño de agua y mezclada cada 10 min por inversión. Cien microlitros de una solución de NaCl 5 M fue adicionada a la mezcla y mezclada empleando vortex, seguida de la adición de 80 µl de CTAB/NaCl (10% v/v CTAB, 0.7 M NaCl) se agitó nuevamente y se incubó la mezcla por 10 min a 65 °C. Finalmente la purificación del DNA genómico, se realizó de acuerdo al método descrito por [Sambrook and Russel \(2001\)](#). El DNA fue cargado dentro de un gel de agarosa al 1% y corrido por 30 min a 100V. Posteriormente el gel fue teñido con una solución de bromuro de etidio 0.5 µg/ml por 5 min y lavado con agua destilada 5 min.

6.1.2.1.2 Amplificación por PCR del gen 16S rDNA

El gen 16S rDNA fue amplificado por PCR y los oligonucleótidos usados fueron 27F y 1492R (Akkermans et al. 1996). Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en 25 µl en un equipo Master Cycler (Eppendorf, Germany). Las mezclas de PCR consistieron de 12.5 µl de Taq PCR Master Mix (Taq PCR Master Mix Kit, Eppendorf, Germany), 1 µl de cada oligonucleótido (0.1 mM), 7.5 – 9.5 µl de agua libre de RNAsas y 3 µl (50 ng) de DNA molde aproximadamente. Las condiciones del ciclo de amplificación del gen 16S rDNA consistieron de 15 min de una desnaturalización inicial de 95 °C; seguida de 35 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94 °C, 1 min de alineamiento a 75 °C y 1 min de extensión a 72 °C, seguida de 10 min de una extensión final a 72 °C. Los productos de PCR fueron purificados por geles de agarosa de 1% con el kit (Qiagen, Hiden, Germany) de purificación QIAquick PCR y secuenciado direccionalmente por Macrogen Inc. (Seoul, Korea).

6.1.2.1.3 Análisis filogenético

Las secuencias del gen 16S rDNA fueron editadas manualmente usando SeaView v.4 (Gouy et al., 2010). Las secuencias fueron comparadas con aquellas disponibles en el Ribosomal Database Project II (Cole et al. 2007) (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp) y en GenBank usando el software BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), con la finalidad de averiguar sus parientes más cercanos. Las primeras secuencias de referencia fueron usadas para realizar el alineamiento con nuestras secuencias usando CLUSTAL X v.2 (Larkin et al., 2007). Los análisis de máxima probabilidad fueron realizados usando PhyML (<http://atgc.lirmm.fr/phyml/>) (Guindon and Gascuel 2003). MODELTEST 3.06 (Posada 2008) fue usado para seleccionar el modelo apropiado de la evolución de la secuencias por el AIC. El modelo TrNef+G fue seleccionado para la búsqueda del árbol. La confianza para cada nodo fue establecida por 10000 réplicas bootstrap. Escherichia coli (NC000913) fue usada como grupo externo. Las similitudes entre las secuencias fueron calculadas usando el software MatGAT v.2.01 (Campanella et al. 2003). Las asignaciones taxonómicas fueron

hechas en base a dos criterios: la posición filogenética y la similitud con las secuencias referencia de las bases de datos.

6.1.2.2 Remoción de HPAs como única fuente de carbono

En este análisis se empleó el inóculo cuyo nivel de remoción de HPAs en presencia de queroseno fue el mayor. Cada ensayo fue realizado por triplicado. El procedimiento experimental fue análogo al establecido en la [6.1.1.4.2](#).

6.1.2.3 Evolución del inóculo en el proceso de remoción de HPA

Se dio seguimiento a los microorganismos integrantes del inóculo empleando la metodología de biología molecular DGGE, para lo cual se decidió dar seguimiento al gen *rpoB* el cual es el gen que codifica para la subunidad β de la polimerasa bacteriana además por ser un gen monocopia, que permitiría identificar cada cepa del cultivo mixto. Así mismo, se dio seguimiento a los integrantes del inóculo mediante cuenta total y análisis morfológico (como se mencionó anteriormente, [6.1.1.2](#)).

6.1.2.3.1 Amplificación del gen *rpoB*

El gen *rpoB* fue amplificado por PCR y los oligonucleótidos usados fueron *rpoB* B2041r y *rpoB* 1698f. Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en 25 μ l en un equipo Master Cycler (Eppendorf, Germany). Las mezclas de PCR consistieron de 12.5 μ l de Taq PCR Master Mix (Taq PCR Master Mix Kit, Eppendorf, Germany), 1 μ l de cada oligonucleótido (0.1 mM), 7.5 – 9.5 μ l de agua libre de RNAsas y 3 μ l (50 ng) de DNA molde aproximadamente. Las condiciones del ciclo de amplificación del gen 16S rDNA consistieron de 15 min de una desnaturalización inicial de 95 °C; seguida de 35 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94 °C, 1 min de alineamiento a 52 °C y 1 min de extensión a 72 °C, seguida de 10

min de una extensión final a 72 °C. El amplicón fue re-amplificado bajo las mismas condiciones pero empleando el oligonucleótido reverso con cola de GC's (rpoB B2041rR) con la finalidad de incrementar la resolución en la separación de los amplicones por DGGE.

Oligonucleótidos:

rpoB 1698f → 5'-AACATCGGTTTGATCAAC-3'

rpoB B2041r → 5'-CGTTGCATGTTGGTACCCAT-3'

rpoB B2041rR → 5'CGCCCCCGCGCCCCGCGCCCGCCCCGCCCGCCCCGCCCGCCCCGTTGCATGTTGGTACCCAT-3'

6.1.2.3.2 Análisis del sistema por la técnica DGGE

Una vez amplificado el gen rpoB de las cepas aisladas se empleó la metodología de electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), para obtener un patrón de bandeo característico para cada cepa; así como, cada tiempo de la toma de muestra con la finalidad de darles seguimiento durante el proceso de remoción de HPA. Se preparó un gel de acrilamida y bis-acrilamida (37.5:1) al 8%, con gradiente desnaturante entre un 40 y 80% (Urea-formamida). Las condiciones del equipo (DCode System, Bio Rad) fueron las siguientes: 100 V (constante) y 0.04 A, durante 4 horas a 60 °C con una rampa de temperatura de 200 °C/h. Se inyectaron 20 µl de cada amplicón con 2 µl de regulación de carga por pozo del gel. Una vez terminada la electroforesis se tiñó el gel con SYBR green (25 µl en 250 ml de agua desionizada), por 30 min y 15 min lavado con agua destilada.

6.1.3 Etapa 3

6.1.3.1 Discusión de la eficiencia de remoción del cultivo mixto seleccionado y un cultivo mixto comercial, en la remoción de HTP e HPA en presencia/ausencia de sustancias húmicas y sales minerales.

La evaluación del nivel de remoción de HTP en un periodo de 34 días, por el cultivo mixto (CM) seleccionado y por el cultivo mixto comercial (CMC) fue llevado a cabo por **Ríos-Rodríguez (2011)** y **González-Garduño (2011)** respectivamente. Para evaluar el efecto de la incorporación de los inóculos se estableció un diseño experimental factorial general: $2^3 \cdot 3^1$. En el diseño experimental se consideraron cuatro factores los cuales fueron: el inóculo (5 ml para el CM, 25 ml para el CMC), ácidos húmicos (6 g/kg), ácidos fúlvicos (4 g/kg) y la presencia de hidrocarburos. Los tres primeros factores fueron evaluados a dos niveles: presencia o ausencia. El cuarto factor (presencia de hidrocarburos) a tres niveles: 5,000; 20,000 y 50,000 mgHTP/kg (**Figura 2**). Así el diseño experimental factorial general (DEFG) consistió de 24 tratamientos. Los tratamientos control fueron: a) suelo al 50% CRA (capacidad de retención de agua), b) suelo al 50% de la CRA y bioestimulado con sulfato de amonio y fosfato monobásico de potasio con una relación C/N/P \rightarrow 100/10/1.

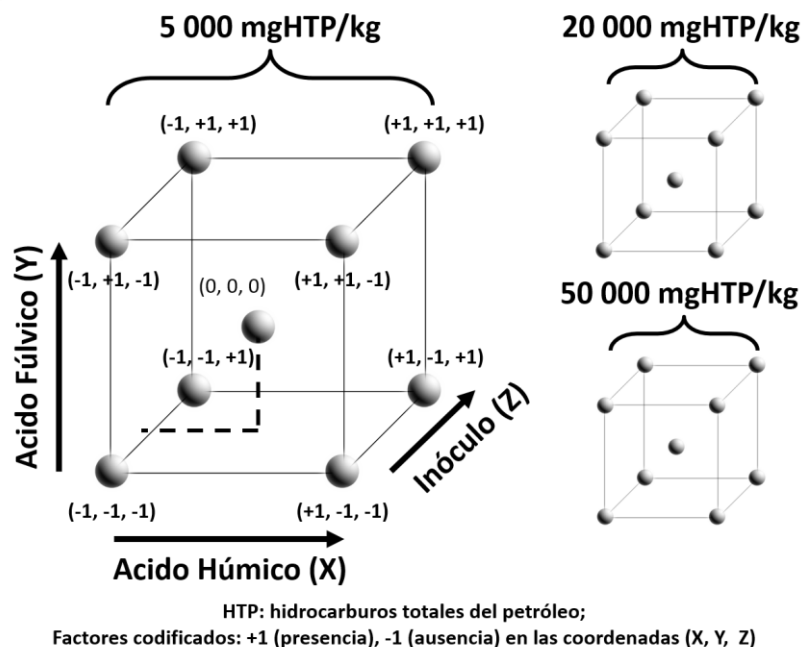


Figura 2. DEFG establecido para evaluar la presencia del inóculo y sustancias húmicas en la remoción de suelo contaminado con combustóleo

6.1.4 Etapa 4

6.1.4.1 Modificación química de las sustancias húmicas

Se desarrollaron e implementaron una serie de metodologías diversas con la finalidad de incorporar grupos funcionales aromáticos o alifáticos en la estructura supramolecular de las sustancias húmicas (SH) con el propósito de incrementar sus propiedades surfactantes. Inicialmente se realizó una caracterización de las SH para evaluar el contenido de protones de los grupos carboxílicos y fenólicos factibles de reaccionar por dos métodos químicos: ataque nucleofílico facilitado en presencia de un ácido fuerte por parte de un grupo alquilo (de un haluro de alquilo) sobre las SH o un ataque nucleofílico facilitado por una sal cuaternaria de amonio que actúa como agente de transferencia de fase. Finalmente se evaluó si la modificación química mejoró la capacidad surfactante de las SH en la desorción de HTP e HPA mediante lavado de suelo contaminado.

6.1.4.1.1 Purificación de los ácidos húmicos

Con la finalidad de analizar y caracterizar los ácidos húmicos en estudio, es necesario realizar una adecuada purificación de este material, para ello se empleó la metodología de la IHSS (International Humic Substances Society):

- Adicionar una solución de 0.1 NaOH/0.1 M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ bajo una atmósfera de N_2 hasta obtener una relación de 10:2 (v/p).
- Extraer la suspensión bajo N_2 con agitación intermitente toda la noche. Se recolectó el sobrenadante por centrifugación a 10000 rev/min (Realizar lavado del precipitado de la misma forma pero solo una hora en agitación, repitiendo la centrifugación).
- Acidificar el sobrenadante con 6 M HCl con agitación constante hasta pH=1.0 y después permitir que la suspensión descanse de 12 – 16 horas.
- Centrifugar la muestra y eliminar el sobrenadante.

- Suspender el AH en una solución 1:1, v/v de 0.5% HCl/HF. Agitar toda la noche a temperatura ambiente. Esto con la finalidad de eliminar silicatos adheridos a las ácido húmicos.
- Transferir el precipitado a un tubo de diálisis con agua destilada (solo lo suficiente) y dializar en un frasco con agua bidestilada, hasta que el agua del recipiente dé una reacción negativa a la presencia de cloruros cuando se adiciona AgNO₃ al 1% o la conductividad de agua del recipiente sea la misma que la del agua bidestilada pura. Esto tiene la finalidad de eliminar el exceso de ácido clorhídrico en la muestra.
- Liofilizar el ácido húmico.

6.1.4.1.2 Caracterización de las SH

La caracterización química de las sustancias húmicas tiene la finalidad de conocer el tipo de estructuras químicas y grupos funcionales presentes, que son de importancia para llevar a cabo la modificación química. Los análisis que se determinaron se muestran en la [Tabla 5](#).

Tabla 5. Análisis realizados para caracterizar las SH

Análisis	Propósito
Acidez de las SH	Conocer los meq H ⁺ /g SH
Análisis elemental	Composición elemental en base al contenido de C,H,O
FTIR (Fourier Transformed Infrared)	Grupos funcionales: carboxilo, hidroxilo, aromático, alifático, etc.
CP-MAS 13C-NMR (cross-polarization magic angle spinning carbon -13 nuclear magnetic resonance spectroscopy)	Grupos funcionales: carboxilo, hidroxilo, aromático, alifático, etc.
H-NMR (proton nuclear magnetic resonance spectroscopy)	Grupos funcionales: carboxilo, hidroxilo, aromático, alifático, etc.
Py-GC/MS (Pyrolysis gas chromatography mass spectrometry)	Detección de unidades estructurales
HPSEC (High Pressure Size Exclusion Chromatography)	Peso molecular y subunidades

6.1.4.1.2.1 Determinación de la acidez

Para llevar a cabo este análisis se utilizó un titulador automático (Radiometer Analytical, TitraLab, modelo TIM840 Titration Manager). La prueba consistió en diluir 1 gramo de material húmico en 100 ml de agua destilada y posteriormente llevar a pH 1 con HCl concentrado. A continuación se adicionó una solución de NaOH 0.5 M hasta alcanzar pH 9 y pH 12 para los AH y AF respectivamente.

6.1.4.1.2.2 Determinación de la composición química (N, C, H)

Se utilizó el equipo Fisons EA 1108 Elemental Analyzer, para llevar a cabo el análisis elemental de las sustancias húmicas para ello se pesó 2 mg de muestra en un recipiente de estaño el cual se insertó directamente en el equipo.

6.1.4.1.2.3 Análisis de Infrarrojo

El espectro de infrarrojo con transformada de Fourier fue obtenido con un equipo Perkin-Elmer Spectrum-One FTIR. Todas las muestras (3 mg) fueron molidas y mezcladas con KBr (100 mg) en un mortero de ágata. Para adquirir el espectro, se hicieron 8 escaneos. Substracción automática de agua, suavizado y la corrección de la línea base fueron hechos usando el software Perkin- Elmer Spectrum 5.0 FTIR.

6.1.4.1.2.4 Análisis de CPMAS ^{13}C NMR

Los espectros de Cross-Polarization Magic-Angle Spinning (CPMAS) ^{13}C NMR fueron adquiridos con un Avance Bruker 300, equipado con una sonda MAS de 4 mm de ancho, operando a una frecuencia de resonancia de 75475 MHz, y una velocidad de giro del rotor de 5.000 ± 1 Hz. Las muestras fueron envasadas en rotores de zirconia de 4 mm con tapas de Kel-F; 1510 puntos de datos se recogieron durante un tiempo de adquisición de 20 ms, con un retraso de reciclaje de 3 s, y más de 2000 escaneos. El retraso de reciclaje (RD) fue elegido después de una evaluación de valores $T_1(\rho\text{H})$ (datos no publicados), para que $\text{RD} > 5T_1(\rho\text{H})$. Un pulso de secuencia del tiempo de contacto variable (VCT) se aplicó con una rampa 1H para tener en cuenta la falta de homogeneidad de la condición de Hartmann-Hahn a altas velocidades de giro del rotor. Una frecuencia de giro de bloqueo promedio de 60 MHz se aplica durante el tiempo de polarización cruzada en rampa. Los tiempos de contacto en la secuencia de VCT fueron: 0.035, 0.045, 0.500, 0.750, 0.850, 1.0, 1.5, 2.0, 3.5, 5.0 y 6.0 ms. Los espectros fueron procesados mediante el uso del software MestRe-C versión 4.3.6.0. Todas las desintegraciones de inducción libre (FID) se transformaron mediante la aplicación de, primero, un 16 k cero relleno y, a continuación, una función exponencial filtro con ensanchamiento de línea (LB) de 100 Hz. Una corrección manual de línea base multipunto con 14 puntos interpolados mediante una función cúbica se utiliza para corregir las líneas de base espectros. Todos los espectros se divide en cinco regiones diferentes: 191-157 ppm (COOH), 157-117 ppm (carbono aromático), 117-98 ppm (carbono anomérico), 98-51 ppm (oxidado de carbono y C de O-polisacáridos y peptídico C-N), y sistemas de 51-0 ppm (carbono alquilo).

6.1.4.1.2.5 Análisis de NMR ^1H

La muestra (6 mg) se disolvió en 700 μl de DMSO deuterado. Se empleó un equipo de 400 MHz (Bruker Avance spectrometer). Este estuvo equipado con una prueba de 5 mm Bruker Inversa de Banda Ancha (BBI, Broad Band Inverse por sus siglas en inglés) trabajando a ^1H de frecuencia de 400.13

MHz fue empleando para llevar a cabo todas las mediciones en estado líquido a una temperatura de 298 +/- K.

Los espectros de ¹H-RMN fueron adquiridos con un retraso de 2 s del equilibrio químico, una longitud de pulso (pulse length) a 90° de 9 s. 15832 el tiempo de puntos de dominio (time domain points), 64 transitorios y 4 escaneos falsos (dummy scans). La anchura espectral de ¹H fue de 16.0204 ppm (6410.256 Hz). Se aplicó una multiplicación de 1.5 Hz a la decadencia de inducción libre (free induction decay) (FID). Todos los espectros fueron procesados con los siguientes software: Bruker Topspin Software (v.1.3) and MestReC NMR Processing Software (v.4.9.9.9).

6.1.4.1.2.6 Análisis de pirólisis fuera de línea

En una charola de cuarzo, se adicionó 500 µl de hidróxido de tetrametilamonio a 500 mg de muestra y se dejó por 2 min. Posteriormente la muestra se colocó a la mitad de un tubo (Pyrex o de cuarzo) específico para realizar la pirólisis. Se colocaron los sistemas de entrada de nitrógeno y recuperación de los gases de arrastre en dos trampas con cloroformo las cuales estuvieron rodeadas de hielo para evitar la volatilización de éste. El horno se programó con una rampa de 10 °C por min hasta una temperatura de 500 °C o 700 °C. Finalizado el proceso se recuperó el cloroformo de las dos trampas se mezclaron en un solo matraz y se lavó el material de vidrio que estuvo en contacto con los gases de arrastre también con cloroformo. El cloroformo fue adicionado a un matraz balón y evaporado en un roto evaporador a 40 °C. Posteriormente el matraz fue lavado con 5 ml de cloroformo para recuperar la muestra. La muestra fue inyectada en un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer Autosystem-XL, equipado con un inyector Split/Splitless con programación de temperatura con un control neumático programable mantenido a una temperatura de 250 °C. Se empleó una columna capilar Restek Rtx-5MS (5% difenil- 95% dimetilpolisiloxano- longitud 30 m, diámetro interno de 0.25 mm y un df de 0.25 mm), en línea un espectrofotómetro de masas Perkin-Elmer TurboMass Gold fue utilizado para el análisis cuantitativo y cualitativo de la muestra extraída. La condiciones usadas para el CG fueron las siguientes: **1)** Temperatura inicial de 40 °C por 5 min; **2)** hasta 250 °C a 3 °C/min; **3)** Una isoterma de 20 min. El tiempo de corrida del CG fue de 95 min. Se empleó helio como gas acarreador a 1.5 ml/min con

un split/flow de 30 ml/min. La temperatura de entrada del CG-MS fue de 280 °C, mientras que para el MS fue de 180 °C. Un tiempo de retraso del solvente de 5 min fue aplicado antes de la adquisición del espectro de masas para prevenir daño del filamento.

Los límites bajo y alto del espectrofotómetro de masas fueron 50 y 400 amu, respectivamente. Se empleó una librería de espectros de masas NIST versión 1.7 para la identificación de picos.

6.1.4.1.2.7 Análisis de cromatografía de exclusión molecular (HPSEC)

La fase móvil para HPSEC fué una solución de NaCl/NaN₃ (2.89 g/l – 0.3 g/l), se utiliza para disolver el AH para alcanzar una concentración de 150 mg/l. La separación de preparación de HA se llevó a cabo a través de un Biosep SEC-S-2000 (300 mm × 21.2 mm) en la columna precedido por una precolumna Biosep SEC-S-2000 (78.0mm x 21.2 mm) por Phenomenex. Una bomba de Gilson 305 (Gilson Inc., Madison, WI, EE.UU.), con un inyector automático modelo Gilson 231 y un detector de UV Gilson 116 fijado en 280 nm se utiliza para detectar las fracciones húmicas en continuo. El peso molecular nominal de la columna preparativa se calibró con sulfonatos de poliestireno de pesos moleculares conocidos. Las soluciones estándar de sulfonatos y las muestras se inyectaron con un inyector Rheodyne rotatorio equipado con un bucle de 5 ml y la elución se ejecutó a un caudal de 0.6 ml/min. El software Unipoint Gilson fue utilizado para registrar de forma automática todas las corridas cromatográficas.

6.1.4.1.3 Estrategia de modificación estructural de las SH

Para llevar a cabo la modificación química de las SH se consideró los grupos funcionales factibles para llevar a cabo las reacciones de alquilación. Considerando una fracción de la estructura de las SH (propuesta por el Dr. Rafael Martínez Palou del Instituto Mexicano del Petróleo) se observa que es multifuncional y sus principales grupos son el hidroxilo (-OH) y el carboxilo (-COOH) (Figura 3). Así, de forma simplificada la molécula de las SH se muestra en Figura 4.

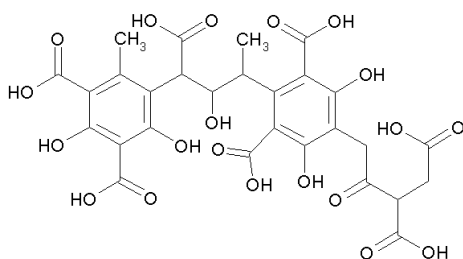


Figura 3. Estructura química simplificada de las SH



Figura 4. Estructura simplificada de las SH

Las reacciones de modificación estructural que se estudiaron fueron por tanto aquellas que se relacionan con la modificación de grupos hidroxilos, fenólicos y grupos carboxílicos, por lo tanto, se propusieron las siguientes modificaciones estructurales mediante:

Formación de éteres (a partir de haluros de alquilo)

Formación de ésteres (a partir de haluros de alcoholes)

El esquema general de las reacciones se muestra en la Figura 5:

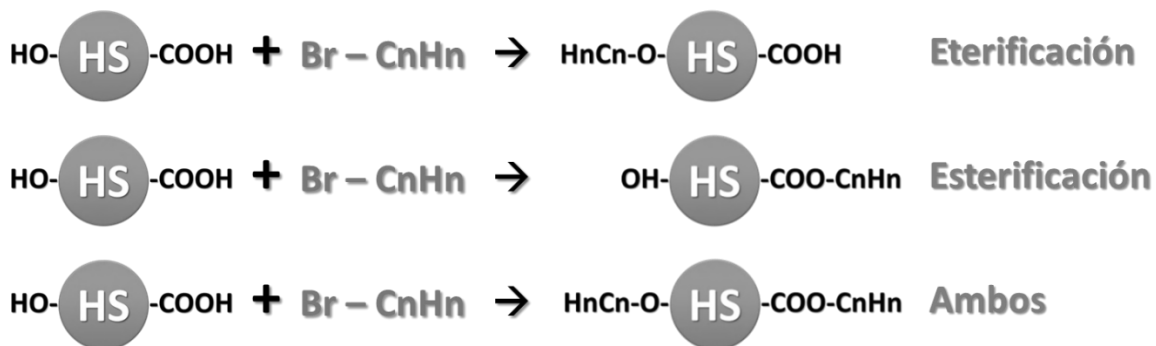


Figura 5. Esquema de reacción para las SH esterificadas/eterificadas

6.1.4.1.3.1 Esterificación asistida por microondas/calentamiento convencional de las SH con alcoholes de cadena larga y haluros de alquilo

El empleo de reactores de microondas para llevar a cabo reacciones de síntesis orgánica y modificaciones estructurales de productos naturales es una práctica cada vez más común ya que las microondas generalmente permiten obtener mejores rendimientos en menos tiempo de reacción y mediante procesos más amigables al ambiente (Martínez-Palou 2006), para los fundamentos teóricos y equipo de microondas ver también el apéndice.

Las reacciones de microondas se realizaron usando un comercialmente disponible microondas mono- modal Discover, fabricado por CEM (<http://www.cem.com>), empleando un vial Pyrex de 10 ml en modo de recipiente cerrado. Las temperaturas de reacción fueron controladas mediante un sensor de infrarrojos externo e interno. Se trabajó con tres métodos para obtener esterificación/eterificación de las SH. Uno de los procedimientos consistió en utilizar MsOH para llevar a cabo un ataque nucleófilo sobre el grupo carboxilo de las SH para permitir la interacción con el grupo alquilo seleccionado y la segunda reacción fue usando Aliquat 336 o $\text{Bu}_4\text{N}^+\text{OH}^-$ como catalizador de transferencia de fases (CTF) (ver apéndice). La primera reacción (A) se llevó a cabo de la siguiente manera; en un recipiente de reacción provisto de un condensador de reflujo, AH (0.25, 0.5 o 0.7g) o AF (0.25, 0.5 o 0.7g) (acidez total de 9 meq H+/g y 8.5 meq H+/g, respectivamente), 0.3g MsOH y 0.5 ml de alcohol (1-octanol (C8), 1-decanol (C10) o 1-dodecanol (C12)) se añadieron a la solución en exceso (5% más que el contenido de protones equimolar para asegurarse de que todos los grupos del ácido puede ser esterificado/eterificado). A continuación, la mezcla de reacción se agitó y se calentó bajo irradiación de microondas con un programa de rampa de 50 °C (0.5 min) hasta 70 °C (3.5 min) cuando se utilizó AF y de 50 °C (0.5 min) con un tiempo de retención de 70 °C (1.5 min) y una temperatura final de 100 °C (2 minutos) en el caso de AH (Figura 6).

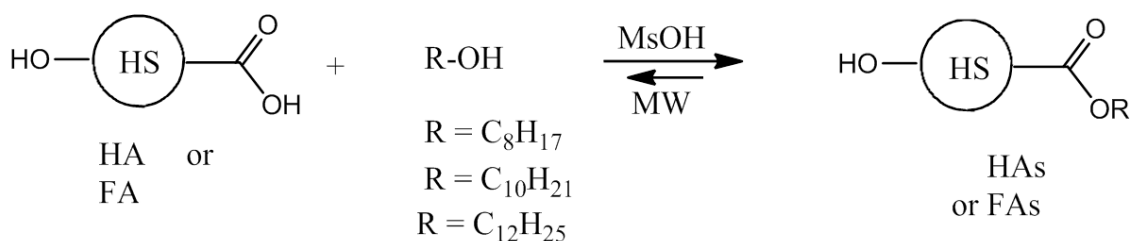


Figura 6. Esterificación asistida por microondas de las sustancias húmicas (SH)

La segunda reacción (B) se realizó de la siguiente manera; en un recipiente de reacción provisto de un condensador de reflujo, ya sea AH (0.5g) o AF (0.5g) se suspendieron en 6 mM Aliquat 336, 8.5 mM de KOH y 6 mM de haluro de alquilo (bromuro de n-pentilo (C5), bromuro de n-octilo (C8), bromuro de n-tetradecilo (C14), bromuro de n-octadecilo (C18)). A continuación, la mezcla de reacción se agitó y se calentó bajo irradiación con microondas a 70/150 °C (AF o AH, respectivamente) por 1, 3 o 5 min. La tercera reacción (C) se realizó siguiendo el protocolo establecido por [Piccolo et al. \(2006\)](#) sin modificación de la siguiente manera; en un recipiente de reacción provisto de condensador de reflujo, AH (0.5g) o AF (0.5g) se suspendieron en 5.5 ml Bu₄N⁺OH⁻. A continuación a la suspensión se añadió 20 ml de THF y se agitó durante 2 h a temperatura ambiente para asegurar la completa neutralización de los protones ácidos y, por lo tanto, la disolución de las SH.

A continuación, 0.5 ml de cada haluro de alquilo (mencionado anteriormente) se añadió a la solución húmica en cantidad estequiométrica molar de protones ácidos para cada SH. Posteriormente, la mezcla de reacción se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente o calentado con microondas a 70 °C durante 1 min, 3 o 5 ([Figura 7](#)). También la potencia de las microondas (datos no mostrados) fue modificada para obtener las condiciones óptimas para altos grados de esterificación/eterificación de los grupos carboxílicos y, por lo tanto, se evaluó su rendimiento en la eliminación de HTP mediante lavado. Tras la finalización de la reacción, el producto final obtenido se filtró al vacío, se lavó con acetona y alcohol etílico (10 ml cada una, dos veces). El producto lavado se dejó en reposo durante la noche a 60 °C en un horno de vacío. Sólo un producto de cada SH cuyo eliminación de HTP fue mayor después de la modificación química se caracterizó por FTIR, CPMAS ¹³C NMR y H⁺ RMN (sólo el AH sin modificar y un derivado, se analizaron mediante este último análisis).

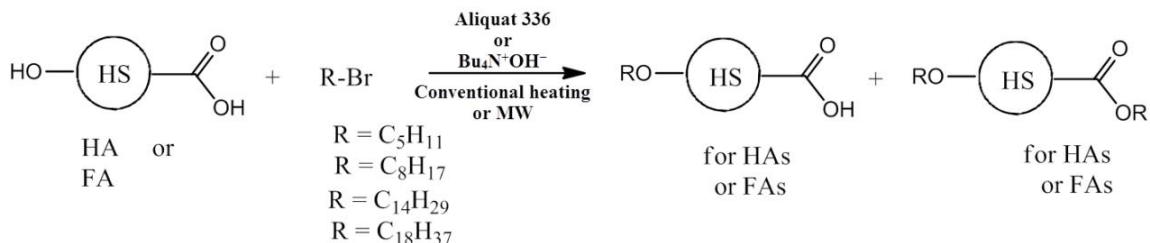


Figura 7. Esterificación/eterificación mediante calefacción asistida por microondas/convencional en reacción de CTF de las sustancias húmicas

6.1.4.1.3.1.1 Evaluación de las SH modificadas químicamente

El suelo contaminado (10g) se suspendió en 100 ml de solución de lavado (2 y 4 g/l para el AF y AH, respectivamente) y se agitó durante 24 h en un agitador rotatorio a 200 rev/min a pH 8.5 para obtener una disolución completa de la SH modificada.

Todas las suspensiones se centrifugaron en tubos de teflón a 10000 rev/min durante 4 minutos con el fin de separar los residuos sólidos de las soluciones de lavado. Los residuos sólidos se secaron a 40 °C y se sometió a extracción por sonicación (EPA 3550b). Las extracciones se realizaron por triplicado y se analizaron por el método cromatográfico como se explica en la siguiente sección.

6.1.4.1.3.1.2 Análisis de HTP residuales

Cada muestra de suelo (10g) tanto antes o como después del lavado, se suspendió en 100 ml de una mezcla de diclorometano/acetona (1:1, v/v) y se sonicó tres veces durante 10 minutos con un sonicador Branson DHA-1000. A continuación, la suspensión se centrifugó (10000 rev/min por 5 min) para separar el residuo del extracto. A continuación, el extracto se analizó por cromatografía de gases con un detector de ionización de flama (FID) (Perkin Elmer Auto System) y una columna capilar Sil 8 CB (Varian) de 25 m, ID 0.32 mm y 0.4 m de espesor de película; se empleó nitrógeno como gas portador a 7.7 psi. Las temperaturas del inyector y detector se fijaron a 250 y 280 °C, respectivamente. La temperatura del horno se aumentó en una etapa: a partir de 170 °C, con un tiempo de retención de 17 min, a 300 °C a 18 °C/min con un tiempo de retención de la temperatura final de 9 min (tiempo total: 33.2 min). El área del pico total de los HTP se utilizó para cuantificar los HTP residuales en las muestras, en relación con el control que era la concentración de HTP inicial.

6.1.4.1.3.1.3 Tratamiento de datos y análisis estadístico

Con el fin de analizar la eliminación de los HTP por los lavados con las SH, los tratamientos se analizaron mediante un análisis estadístico empleando el programa NCSS 2007, mediante la prueba de comparaciones múltiples de Duncan, Fisher (LSD) y Tukey-Kramer ($P < 0.05$).

6.1.4.1.3.2 Esterificación de las SH mediante catálisis de transferencia de fase (método modificado)

La reacción se realizó siguiendo el protocolo establecido por [Piccolo et al. \(2006\)](#) con modificación de la siguiente manera. AH purificados (500mg); acidez total 6,05 H⁺/g, se disolvieron en 10 ml de agua desionizada con 1.1 ml de solución de NaOH (1.5 M) con el fin de alcanzar un pH de 9. A continuación, 200 µl de hidróxido de tetrabutilamonio (Bu₄N⁺OH⁻) se añadieron a la mezcla. La suspensión se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente para asegurar la completa neutralización de los protones ácidos y, por tanto, la disolución del AH. Los haluros de alquilo se añadieron a la solución a 80, 60 y 40% con relación al contenido molar de protones ácidos en los AH. La mezcla de reacción se agitó a 45 °C y 24 h (**Figura 8**). Después, la mezcla de reacción se trató con 10% de solución de HCl para ajustar el pH a 1. El agente alquilante residual y las sales de tetrabutilamonio se eliminaron del producto de reacción mediante lavado (cinco veces, 25 ml cada lavado) del residuo con agua desionizada acidulada y fría (10 °C, pH: 1). El agua de lavado se eliminó por centrifugación de la suspensión. Por último, el residuo se secó a 40 °C.



Figura 8. Esterificación/eterificación en reacción de CTF de las sustancias húmicas

6.1.4.1.3.2.1 Evaluación de las AH modificadas químicamente

Para evaluar el efecto de la modificación química de los ácidos húmicos se implementó una metodología de lavado de suelo, la cual consistió en adicionar 100 ml de una solución de AH (con ó sin modificación química) con una concentración de 5 g/l a un suelo contaminado artificialmente (10g) con fluoranteno (2000 mg/kg), antraceno (4000 mg/kg), fenantreno (4000 mg/kg) y pireno (4000 mg/kg). A continuación se llevó a cabo el lavado, mediante agitación orbital a 200 rpm durante 16 horas (toda la noche). Después la mezcla se centrifugó a 10000 rev/min durante 4 min. El suelo lavado (precipitado) se secó a 40 °C durante 24 horas.

6.1.4.1.3.2.2 Análisis de HPA residuales

El análisis de HPA inicial y residual se realizó a 3g de suelo seco el cual fue colocado en un sobre de papel filtro Whatman No.4, suspendido en 50 ml de una mezcla acetona/diclorometano (1:1, v/v) y sonificado con un equipo Misonix XL2020. Una potencia de 55 W fue aplicada por 12 min a la suspensión. El procedimiento se repitió tres veces. Finalmente todos los extractos se combinaron y se concentraron hasta un volumen final de 7 ml. Se realizó una dilución 1:100 (v/v) para realizar el análisis. La muestra fue inyectada en un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer Autosystem-XL, equipado con un inyector Split/Splitless con programación de temperatura con un control neumático programable mantenido a una temperatura de 250 °C. Una columna capilar Restek Rtx-5MS (5% difenil- 95% dimetilpolisiloxano- longitud 30 m, diámetro interno de 0.25 mm y un df de 0.25 mm), y un espectrofotómetro de masas Perkin-Elmer TurboMass Gold fue utilizado para el análisis cuantitativo y cualitativo de la muestra extraída. La condiciones usadas para el CG fueron las siguientes: 1. Temperatura inicial de 170 °C por 17 min; 2. hasta 300 °C a 18 °C/min; 3. Una isoterma de 9 min. El tiempo de corrida del CG fue de 33.2 min. Se empleó helio como gas acarreador a 1.5 ml/min con un split/flow de 30 ml/min.

6.1.4.1.3.2.3 Tratamiento de datos y análisis estadístico

Las extracciones por sonicación se realizaron para cada suelo por triplicado, antes y después del lavado del suelo. Los resultados fueron el promedio ponderado para proporcionar error experimental. La diferencia significativa (LSD) del ensayo se utilizó para determinar la diferencia estadística significativa de la remoción de los HPA. Los datos se consideraron significativamente diferentes para un valor $p(F) < 0.05$. La versión Design Expert versión 8.0.5 se utilizó para todos los análisis. Con el fin de analizar si existía diferencia significativa entre tratamientos en la remoción de HPA, los tratamientos se analizaron mediante el programa NCSS 2007, empleando prueba de comparaciones múltiples de Duncan, Fisher (LSD) y Tukey-Kramer ($P < 0,05$).

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Etapa 1

7.1.1 Aislamiento de microorganismos de los materiales orgánicos

Los microorganismos hidrocarbonoclastas aislados de los cuatro materiales orgánicos (EL, VC, L y BC) se muestran en la **Tabla 6**. Durante el primer aislamiento se observaron 174 microorganismos diferentes de acuerdo a su morfología colonial; sin embargo, cuando se intentaron aislar de forma axénica se perdieron 17 cepas (presumiblemente como consecuencia de la ausencia de factores de crecimiento, vitaminas o cofactores específicos en el medio de cultivo), dando como resultado 157 microorganismos hidrocarbonoclastas (**Tabla 7**).

Tabla 6. Microorganismos hidrocarbonoclastas observados en placa de agar nutritivo (bacterias) o agar sabouraud (hongos)

	EL	VC	L	BC	Total
Bacterias	21	39	29	33	122
Hongos	7	16	10	19	52
Total	28	55	39	52	174

EL: Extracto de leonardita; VC: Vermicomposta; L: Lombriz; BC: Bagacillo de caña

Tabla 7. Microorganismos hidrocarbonoclastas aislados en medio mineral

	EL	VC	L	BC	Total
Bacterias	20	35	28	29	112
Hongos	6	15	8	16	45
Total	26	50	36	45	157

EL: Extracto de leonardita; VC: Vermicomposta; L: Lombriz; BC: Bagacillo de caña

El análisis microbiológico mostró que en el BC se aisló una población de 2.7×10^7 UFC/g y una cuenta microbiana de 45 cepas (**Tabla 6 y 7**), de las cuales 2.9×10^5 UFC/g son hidrocarbonoclastas. Como se puede observar, las bacterias hidrocarbonoclastas son muy abundantes posiblemente debido a que existe una presión de selección por sustrato; la flora asociada al bagacillo de caña debe de ser capaz de degradar sus componentes principales como son lignina, hemicelulosa y celulosa.

Existen diversas enzimas involucradas en el rompimiento de estructuras ligninolíticas como polifenol oxidasa, manganeso peroxidasa o lacasa, en el caso de los hongos y en enzimas tipo oxigenasas en el caso de las bacterias. Esta actividad enzimática sugiere que los microorganismos asociados al bagacillo de caña son capaces de consumir hidrocarburos alifáticos y aromáticos. La morfología colonial de algunos microorganismos aislados del BC se observan en la [Figura 9](#).



Figura 9. Microbiota asociada al BC: bacterias (Agar nutritivo) y hongos (Agar maltosa Sabouraud) bajo una dilución 1×10^5 . Microbiota hidrocarbonoclasta, (Agar Mineral + queroseno, dilución 1×10^5)

La VC, desecho metabólico de la digestión de la lombriz, mostró una cuenta microbiana de 1.28×10^9 UFC/g ([Tabla 8](#)), de las cuales 2.8×10^5 UFC/g son hidrocarbonoclastas. Debido a que la vermicomposta posee una gran variedad de nutrientes; entre los cuales figuran aminoácidos, vitaminas, azúcares, etc. ([Ferruzi 1994](#)); posee una elevada microbiota total, con 50 cepas distintas ([Tabla 6](#)). La presencia de microorganismos degradadores de hidrocarburos era de esperarse debido a la mezcla compleja de materia orgánica transformada por este tipo de flora microbiana. En el presente estudio se

utilizó vermicomposta producida a partir de paja de avena y estiércol bovino, previamente composteados. La paja al ser un desecho agroindustrial al igual que el bagacillo de caña; poseen estructuras ligninolíticas y celulolíticas que determinan la flora microbiana asociada. La morfología colonial de algunos microorganismos aislados del VC se observan en la [Figura 10](#).

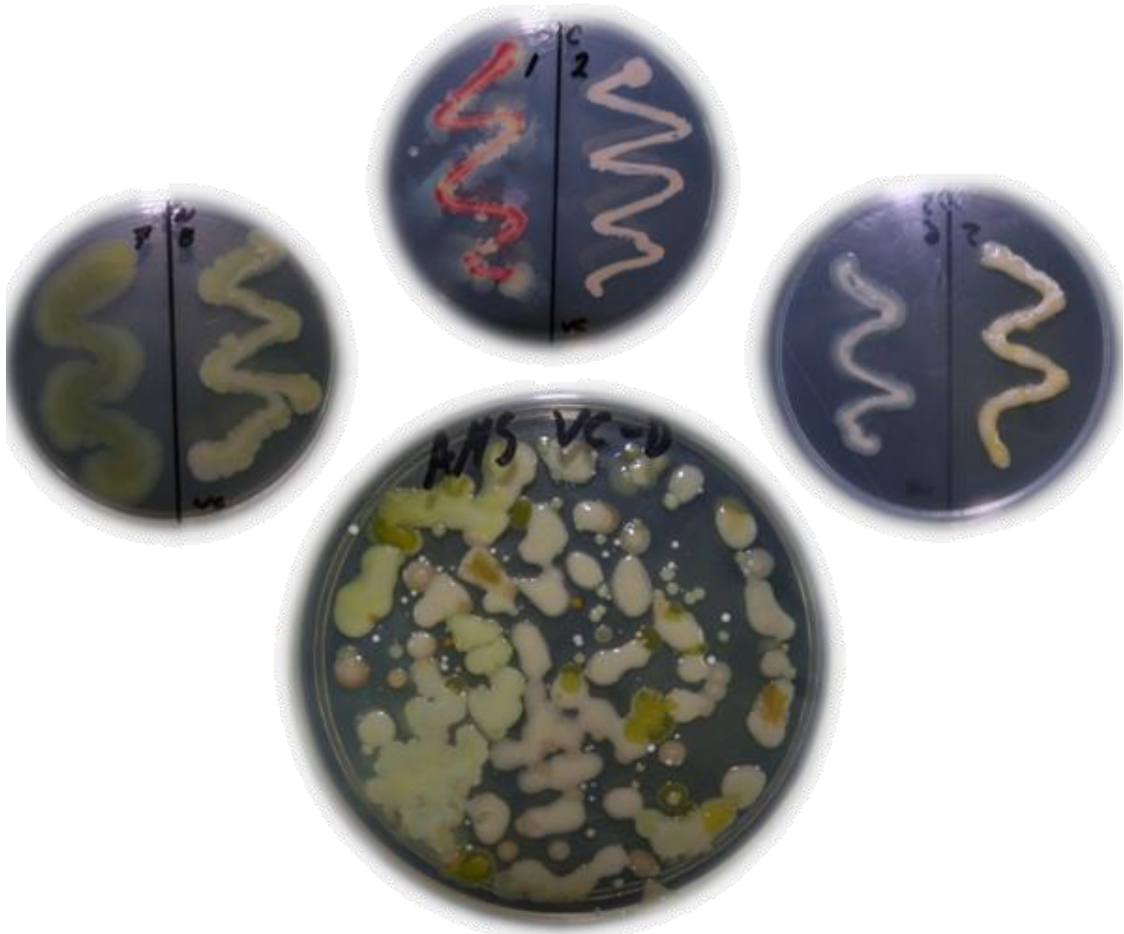


Figura 10. Microbiota asociada a la VC: bacterias (Agar nutritivo) y hongos (Agar maltosa Sabouraud) bajo una dilución 1×10^5 . Microbiota hidrocarbonoclasta, (Agar Mineral + queroseno, dilución 1×10^5)

La flora microbiana hidrocarbonoclasta del EL fue de 1.51×10^7 UFC/g con mayor cuenta microbiana (26 cepas ([Tabla 7 y 8](#)), de las cuales 3.5×10^6 UFC/g son hidrocarbonoclastas, sin embargo; posee menor contenido de hongos, posiblemente debido a que las bacterias se pueden adaptar a condiciones extremas como es el bajo contenido de humedad y relaciones C/N elevadas. Esto podría indicar que las cepas asociadas a este material están bien adaptadas a asimilarlo como fuente de carbono, nitrógeno y energía. No obstante los ácidos húmicos, poseen una estructura molecular diversa, conformada por péptidos, oligosacáridos, quinonas, hidrocarburos, anillos aromáticos, etc.; que los

hace adecuados para el consumo microbiano en procesos co-metabólicos donde son reducidos u oxidados para consumir diversas moléculas aledañas a estos (Tan 2003). La morfología colonial de algunos microorganismos aislados del EL se observan en la Figura 11.



Figura 11. Microbiota asociada al EL: bacterias (Agar nutritivo) y hongos (Agar maltosa Sabouraud) bajo una dilución 1×10^3 .

Microbiota hidrocarbonoclasta, (Agar Mineral + queroseno, dilución 1×10^3)

Finalmente la lombriz (L) posee una flora microbiana hidrocarbonoclasta de 4.4×10^8 UFC/g con una cuenta microbiana de 50 cepas (Tabla 7 y 8), de las cuales 4.4×10^5 UFC/g son hidrocarbonoclastas. Se ha reportado que la lombriz posee microbiota hidrocarbonoclasta en su intestino. Las lombrices tienen un sistema digestivo muy completo, debido a la asimilación y al impacto en la actividad microbiana, este proceso de digestión es muy importante en la regulación de la dinámica de la materia orgánica. A través del paso por su intestino, los materiales ingeridos son rápidamente degradados de manera física, química y biológica hasta convertirlos en las excretas. Esto lo logran por medio de ayuda mecánica a lo largo del intestino y las diferentes enzimas que producen. De las principales enzimas encontradas en el

intestino de la lombriz se pueden citar: quitinasas, proteasas, fosfatasas, peroxidasa, celulasas, y algunas enzimas que participan en la glicólisis (Lattaud et al. 1999; Hassett et al. 1988, Quintero 2002) las cuales le permiten digerir bacterias, protozoarios, hongos y descomponer parcialmente residuos de plantas.

Se ha encontrado que las lombrices poseen citocromo P-450, actividad monooxigenasa, que son enzimas responsables del metabolismo de HPA por hongos y algas (Cerniglia 1993). Además *Eisenia foetida* presenta un complejo glicolipoproteínico (G-90) con actividad mitogénica y antioxidante esto hace pensar que la lombriz se sirve de dicho complejo para protegerse del daño celular contra contaminantes como los xenobióticos (Grdisa et al. 2001). La morfología colonial de algunos microorganismos aislados de lombriz se observan en la Figura 12.



Figura 12. Microbiota asociada a la L: bacterias (Agar nutritivo) y hongos (Agar maltosa Sabouraud) bajo una dilución 1×10^5 .
Microbiota hidrocarbonoclasta, (Agar Mineral + queroseno, dilución 1×10^5)

Se han reportado diferentes bacterias asociadas al intestino de la lombriz, a las excretas o en el fluido interno de sus huevecillos, como: *Pseudomonas*, *Acidobacterium*, *Nocardia*, *Alcaligenes*, *Rhodococcus*, *Azotobacter* y algunos hongos como *Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus* entre otro gran número de microorganismos (Morgan y Burrows 1982, Singleton et al. 2003, Pizl y Nováková 2003). Algunos de estos microorganismos pueden degradar HPA, tal es el caso de *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Azotobacter* y *Penicillium* (Cerniglia 1993, Johnsen et al. 2005).

Tabla 8. Propiedades fisicoquímicas y biológicas de los materiales orgánicos

	Determinación	Unidades	Referencia	VC	EL	BC	L
Físicas	Humedad	%	AS - 06†	4 ±0.5	14	5 ±0.5	
	Capacidad de retención de agua	%	AS - 06†	30 ±4	----	700 ±5	
	Densidad	g/cm ³	AS - 04†	0.5 ±0.02	0.6	0.15 ±0.02	
Químicas	Materia orgánica	%	AS - 07†	28.8 ±0.6	81.9	82.1 ±0.7	
	Carbono total	%	TOC-V csn	17 ±0.4	42.8	47.6 ±0.5	
	Carbono orgánico	%	TOC-V csn	16.7 ±0.5	42.8	47.6 ±0.5	
	Carbono inorgánico	%		0.3 ±0.5	----		
	Nitrógeno total	%	Fernández, 2006	1.32 ±0.5	0.83	0.23 ±0.5	
	Fósforo asimilable	%	AS - 10†	2 ±0.02	< 0.1	0.01 ±0.02	
	pH		AS - 02†	6.9 ±0.1	9.85	6.5 ±0.1	
	Ácidos húmicos	%	IHSS▲	2.34 ± 0.6	91.5	----	
Ácidos fúlvicos	%	IHSS▲	1.86 ± 0.7	4	----		
Biológicas	Carbono de biomasa	gBC/kg		9.84 ±0.51	5.52 ±0.32	4.43 ±0.49	
	Bacterias	UFC/g		1.28 × 10 ⁹	1.51 × 10 ⁷	2.7 × 10 ⁷	4.4 × 10 ⁸
	Hongos	UFC/g		8.2 × 10 ⁴	3.2 × 10 ³	9.2 × 10 ⁴	3.1 × 10 ³
	Bacterias Hidrocarbonoclastas	UFC/g		2.8 × 10 ⁵	3.5 × 10 ⁶	2.9 × 10 ⁵	4.4 × 10 ⁵
	Hongos Hidrocarbonoclastas	UFC/g		2.6 × 10 ⁴	2.6 × 10 ³	7.3 × 10 ⁴	3.9 × 10 ²

• Las características fisicoquímicas del extracto de leonardita (EL) fueron adquiridos de la hoja de especificación del producto PowHumus de Humintech ®. † NOM-021-RECNAT-2000; ▲ IHSS: International Humic Substances Society (<http://www.ihss.gatech.edu/>)

De la cuenta total microbiana, las bacterias fueron el grupo microbiano predominante en los cuatro materiales orgánicos, lo cual es consistente con la noción propuesta por [Curtis et al. \(2002\)](#), las bacterias son el grupo de microorganismos más comúnmente encontrados en la naturaleza. La alta proliferación microbiana ha sido atribuida al extensivo metabolismo aerobio, el cual permite la rápida mineralización de un amplio número de compuestos orgánicos ([Meyer 2000](#)). En lo que concierne a los hongos, aunque su cuenta total es muy baja, debe ser mencionado que las bacterias proliferan inicialmente, mientras que los hongos son estimulados hacia el final de la mineralización de la materia orgánica, indicando que estos procesos dependen de la acción conjunta de ambos.

Cuando los microorganismos aislados de los materiales de estudio se intentaron crecer en caldo nutritivo o maltosa Sabouraud para realizar cinéticas de crecimiento, no crecieron 17 cepas, dando como consecuencia la reducción en el número de cepas mostrado en la [Tabla 9](#), debido quizás a la falta de trazas o microelementos presentes en las primeras resiembras de estos microorganismos durante su aislamiento.

Tabla 9. Microorganismos hidrocarbonoclastas empleados

	EL	VC	L	BC	
Bacterias	20	31	25	24	100
Hongos	4	14	6	16	40
	24	45	31	40	140

EL: Extracto de leonardita; VC: Vermicomposta; L: Lombriz; BC: Bagacillo de caña

7.1.1.1 Cinéticas de crecimiento de los microorganismos aislados

Se realizaron cinéticas de crecimiento de 52 bacterias (Figura 13), con la finalidad de establecer el tiempo aproximado necesario para alcanzar *la fase de crecimiento exponencial*, para realizar los inóculos de los tratamientos y determinar la capacidad de remoción de los HPA. De esta manera se estableció que en promedio las bacterias alcanzaron la fase exponencial en aproximadamente 6 a 8 horas.

Empleando estas cinéticas de crecimiento, se estableció un cronograma de tiempos de cultivo para cada cepa que integra el conjunto de microorganismos hidrocarbonoclastas de cada material orgánico en estudio (Figura 14), de tal forma que cada cepa fuera inoculada en la misma fase exponencial. Dependiendo del tiempo que requiere cada microorganismo en alcanzar una *densidad óptica de 0.5*, el tiempo varió entre 4 y 115 horas. Finalmente se procedió a la preparación de cada inóculo como se indica en la metodología.

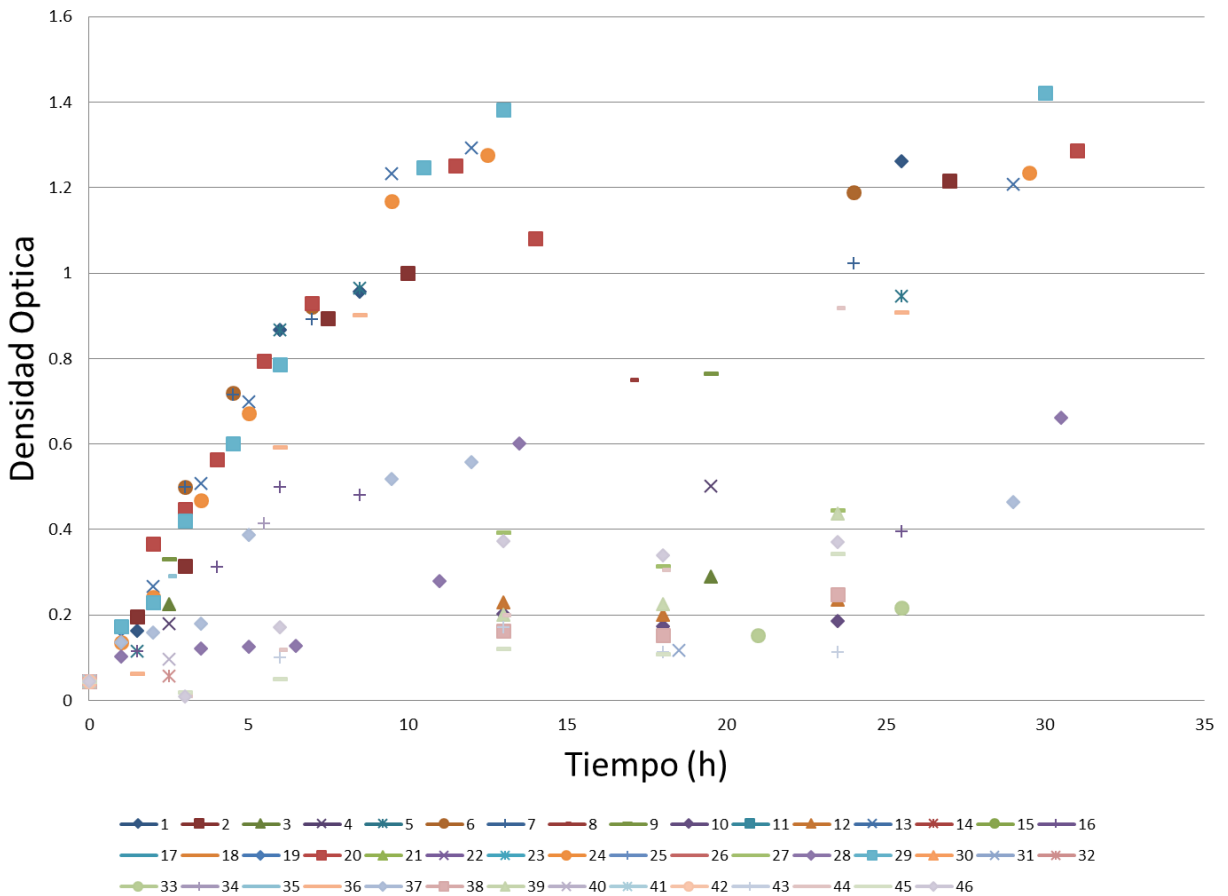


Figura 13. Cinética de crecimiento de algunas bacterias hidrocarbonoclastas aisladas

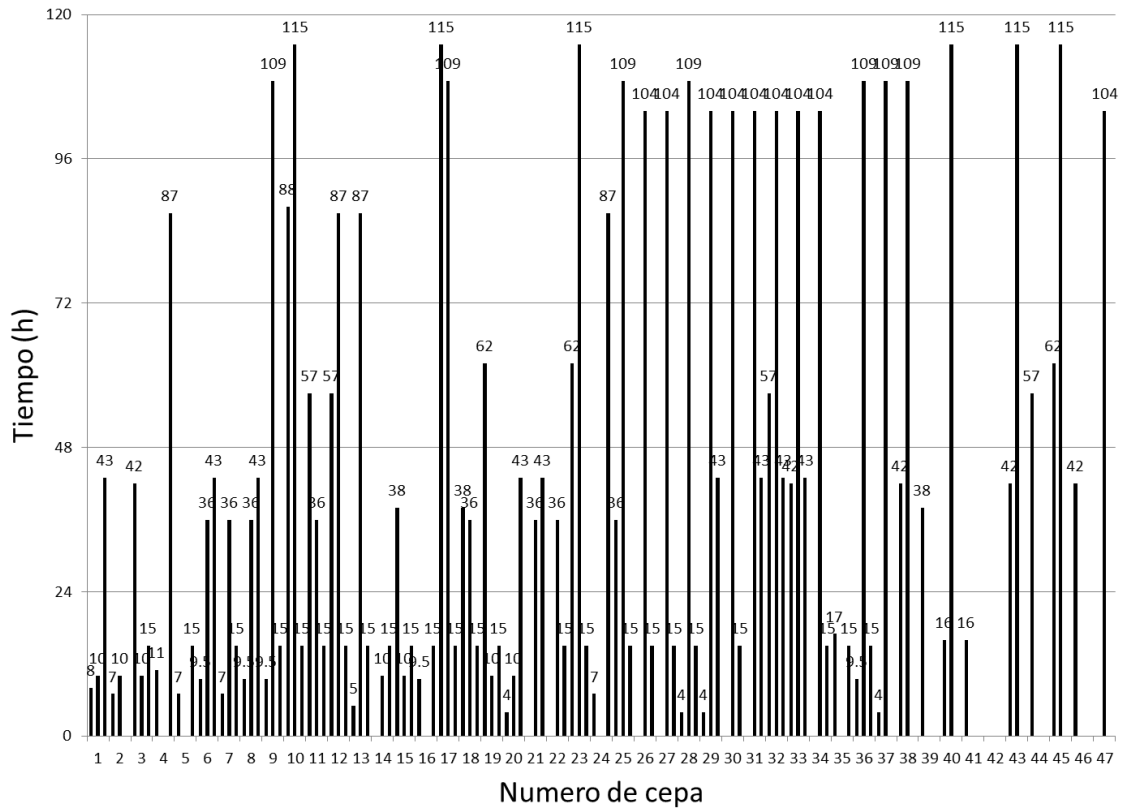


Figura 14. Cronograma empleado para preparar los inóculos de los cuatro materiales orgánicos

7.1.2 Evaluación de la capacidad de remoción de HPA por mezclas de las MT

El propósito de este análisis fue evaluar la capacidad de remover HPA en medio líquido empleando la microbiota total (MT) obtenida de dilución de los materiales orgánicos en estudio. Esta información indica que los materiales orgánicos en estudio pueden incorporar o proporcionar microorganismos hidrocarbonoclastas; los cuales pueden contribuir a la degradación y/o remoción de los hidrocarburos presentes en suelos contaminados.

El análisis cromatográfico de los sistemas analizados muestra que los niveles de remoción de los HPA para los 15 sistemas en estudio, está en función de la complejidad de la microbiota que lo componen (**Figura 15**). Existen reportes de niveles de remoción del 100% para los hidrocarburos: Acenaftileno, Acenafteno y Fenantreno; del 95% para el antraceno y del 90 al 75% para el fluoranteno y benzo[a]pireno respectivamente (**Olivera et al. 2003**). Los sistemas experimentales binarios en su mayoría resultaron ser los que obtuvieron mejores niveles de remoción, mientras que los sistemas

individuales fueron poco eficientes en la remoción de HPA. De acuerdo con los resultados, la interacción de las microbiotas provenientes de los materiales orgánicos fueron capaces de remover con mayor facilidad HPA de menor peso molecular como el acenaftileno y el acenafteno, en función a la posible colaboración de los miembros de éstas.

Es importante mencionar el papel que representa la presencia del EL (ácidos húmicos), en los sistemas. Debemos recordar que se realizó una dilución 1:20 de este material; por lo que, pese al proceso de filtración se obtuvo una solución de ácidos húmicos los cuales irremediamente tendrán un efecto en los sistemas. El efecto de la presencia del EL sobre la remoción de HPA, puede ir desde un 6% hasta un 21% más, respecto a aquellos tratamientos sin este elemento. Asimismo se ve favorecida la remoción de moléculas más complejas como el fenantreno o fluoranteno.

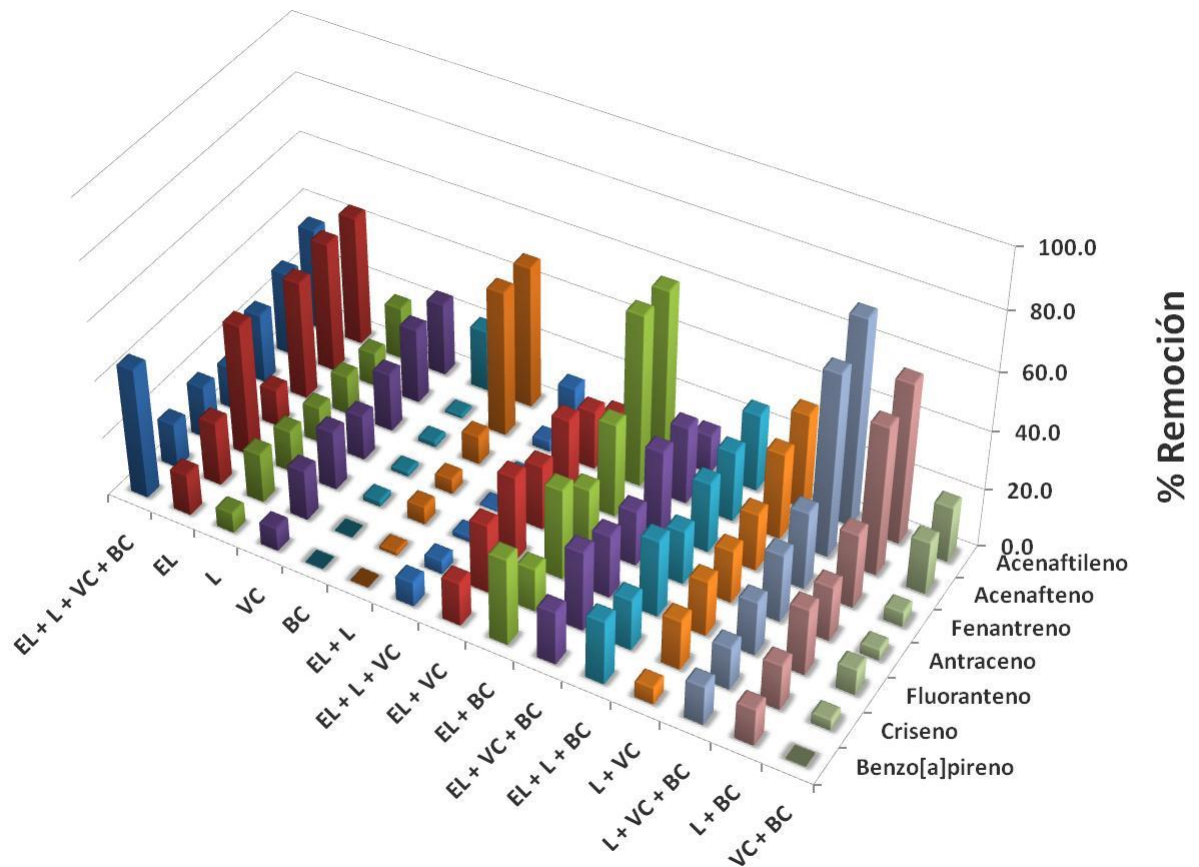


Figura 15. Porcentaje de remoción de HPA por la MHT

Lovley et al. (1996) demostró que los ácidos húmicos pueden ser empleados como aceptores finales de electrones durante procesos aerobios o anaerobios en suelo contaminado con HPA. Considerado

estas evidencias los ácidos húmicos pueden contribuir a la oxidación o reducción de los hidrocarburos presentes para favorecer la remoción más eficientemente, ya sea debido a la flora microbiana proporcionada por los ácidos húmicos o por el empleo de éstas por lo microorganismos presentes en el sistema. Los ácidos húmicos contienen estructuras del tipo quinonas que están involucradas en estos procesos de óxido reducción. [Field y Cervantes \(2005\)](#) demostraron la interacción de microorganismos en reacciones REDOX empleando humus y quinonas relacionadas; lo cual apoya nuestra suposición del efecto de los ácidos húmicos derivados del extracto de leonardita en la remoción de HPA. Numerosos estudios indican la capacidad de los ácidos húmicos de interactuar con hidrocarburos policíclicos aromáticos ([Perminova et al. 2006](#), [Saparpakorn, Kim y Hannongbua 2007](#)), sin embargo; la mayoría de los estudios se enfocan a hidrocarburos policíclicos aromáticos modelo como el pireno y no en mezclas complejas, como lo es en este estudio. La interacción de los HPA y los ácidos húmicos comprende la incorporación de los HPA a su centro hidrofóbico al formar estructuras semejantes a micelas o interaccionando con ellos mediante enlaces de tipo π - π ([Kubicki y Apitz 1999](#), [Käcker 2002](#), [Wijnja, Pignatello y Malekani 2004](#)). Para simplificar la visualización de los resultados, estos fueron divididos en dos figuras, con presencia de ácidos húmicos y en ausencia de ellos ([Figura 16 y 17](#)). Podemos observar que la presencia de ácidos húmicos incrementó la remoción de los HPA, aunque en ambos casos el nivel de remoción fué menor conforme se incrementa la complejidad estructural y peso molecular de los HPA. No obstante; es posible apreciar que un sistema de cada figura sobresale en la remoción de HPA, resultados que se muestran en la [Tabla 10](#). Así, podemos apreciar que el sistema con la microbiota del EL + BC, fué el que tuvo los mayores niveles de remoción entre todos los tratamientos.

Tabla 10. Porcentaje de remoción de HPA de los tratamientos (EL + BC) y (L + VC + BC)

	EL + BC	L + VC + BC
Acenaftileno	57.5 ± 1.5	70.8 ± 1.8
Acenafteno	58.9 ± 2.1	62.7 ± 1.7
Fenantreno	31.9 ± 1.2	26.4 ± 1.3
Antraceno	20.0 ± 0.9	23 ± 1.5
Fluoranteno	30.9 ± 1.3	18.3 ± 2.2
Criseno	14.6 ± 0.7	14.3 ± 1.2
Benzo[a]pireno	29.5 ± 1.5	13.1 ± 1.8

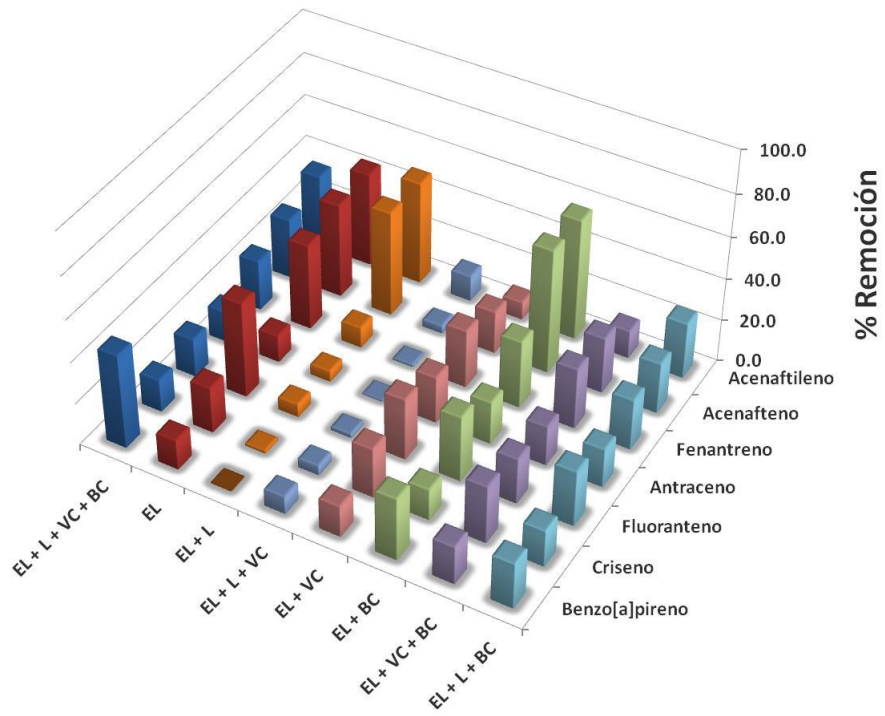


Figura 16. Porcentaje de remoción de HPA por la MT en presencia de EL (ácidos húmicos)

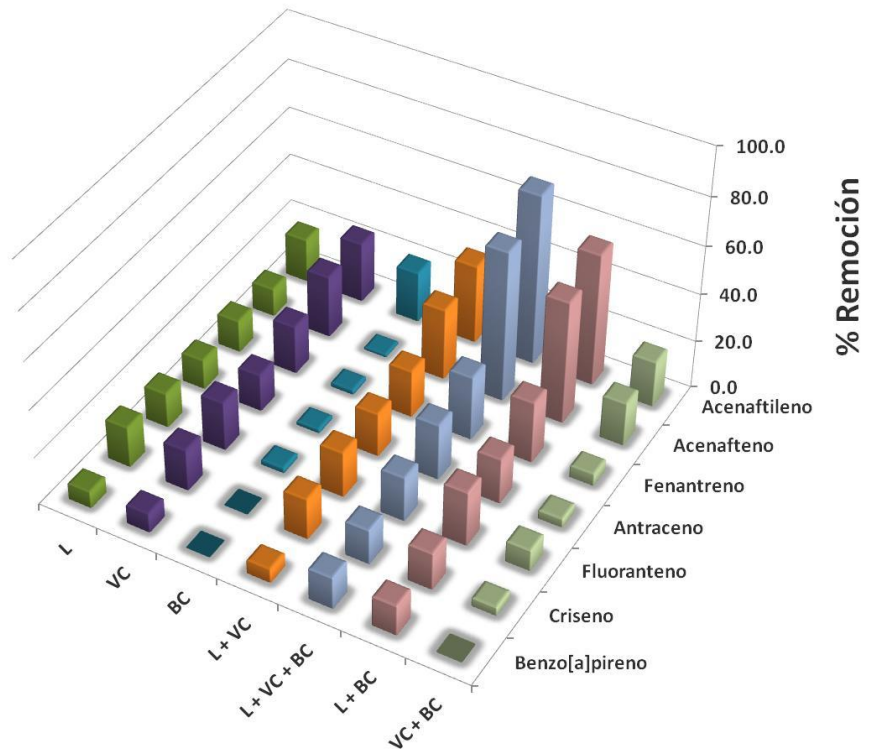


Figura 17. Porcentaje de remoción de HPA por la MT en ausencia de EL (ácidos húmicos)

La verificación de la capacidad para remover HPA a partir de las cepas aisladas, consistió de un ensayo al cual se realizó siembra en placa mediante estria abierta en medio mineral y queroseno, de capa cepa hidrocarbonoclasta aislada de los materiales orgánicos en estudio, en la cual se incorporó una mezcla de los HPA en una concentración de 100 mg/l en el centro de esta. Así, se observaría cuáles y cuantos microorganismos aislados serían capaces de crecer en presencia de HPA. Los resultados del ensayo se muestran en la [Tabla 10](#) y [Figura 18](#). Como podemos observar los mejores sistemas con y sin ácidos húmicos poseen un gran número de microorganismos; sin embargo, debido a que en este experimento se empleó la microbiota total que se obtuvo por la dilución directa de los materiales en estudio, se debe considerar la participación de los microorganismos no cultivables hidrocarbonoclastas y la participación de los microorganismos heterótrofos. La participación de un número preciso de microorganismos hidrocarbonoclastas capaces de crecer en HPA se verá más reflejada en el ensayo con inóculos hidrocarbonoclastas aislados conocidos.

El hecho de que el 81% de los microorganismos aislados fueran capaces de crecer en presencia de diversos HPA ([Tabla 11](#)), muestra que la flora microbiana asociada a los materiales orgánicos usados en este estudio, pueden ser usados como fuente de microorganismos para mejorar la remoción de HPA. Así mismo, se confirman los resultados encontrados por [Pérez-Armendáriz et al. \(2004\)](#) quienes mostraron específicamente, la contribución de microorganismos hidrocarbonoclastas del bagacillo de caña y su contribución sinérgica en un suelo para mejorar la remoción de hidrocarburos.

Tabla 11. Microorganismos que crecieron en presencia de los HPA en estudio

Tratamiento	Ht/T*	Tratamiento	Ht/T*	Tratamiento	Ht/T*
AH+L+VC+BC	81/100	AH+L	37/45	AH+L+BC	57/69
AH	20/20	AH+L+VC	61/76	L+VC	41/56
L	17/25	AH+VC	44/51	L+VC+BC	61/80
VC	24/31	AH+BC	40/44	L+BC	37/49
BC	20/24	AH+VC+BC	64/75	VC+BC	44/55

*Ht/T: tolerantes a los HPA/microorganismos totales hidrocarbonoclastas

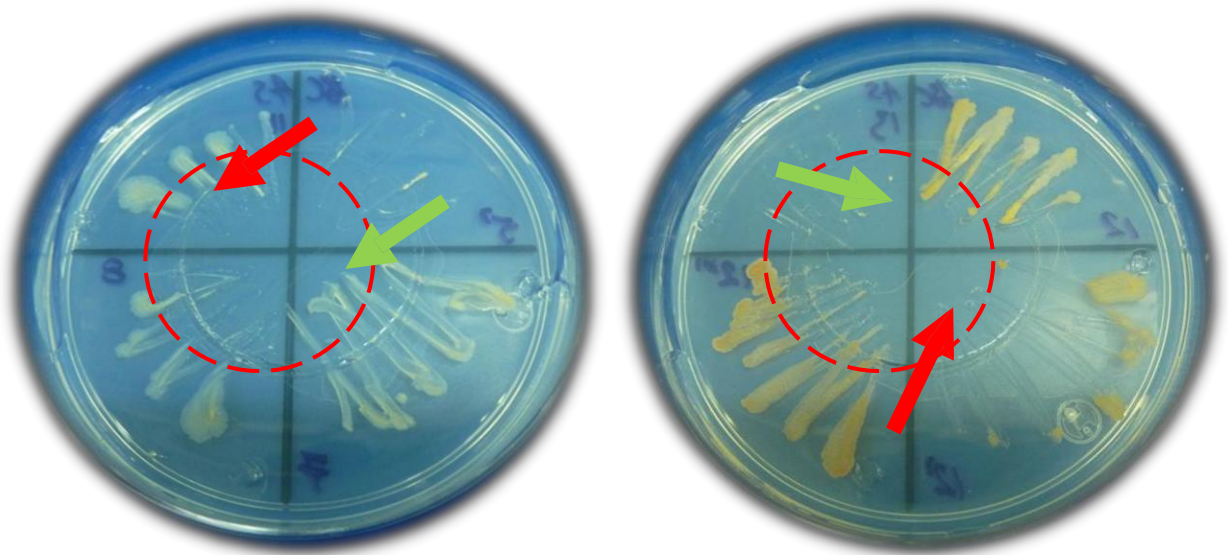


Figura 18. Crecimiento positivo (verde) y negativo (rojo) de algunos microorganismos en presencia de HPA (anillo con línea discontinua en rojo)

Se analizó la variación de la tensión superficial de los sistemas empleando un tensiómetro (TD-1C Lauda), con la finalidad de conocer si se producen biosurfactantes en el sistema (Figura 19). Como podemos observar el medio mineral presenta una tensión superficial de 70 mN/m (agua destilada 71 mN/m), la presencia de ácidos húmicos disminuye la tensión hasta unos 60 mN/m apreciándose el efecto surfactante de éstos a una concentración de 0.8 mg/l. Cuando a los sistemas se les adiciona queroseno, la tensión disminuye aún más, hasta 47 mN/m; sin embargo, es necesario indicar que la lectura cuando se tiene queroseno en solución no es muy correcta debido a que se forma una lámina de hidrocarburo que interfiere con una lectura correcta del equipo. Este efecto se aprecia debido a que el queroseno puro tiene una tensión superficial de sólo 26 mN/m. La adición de las alícuotas (1 ml) de las diluciones (1/20) de cada material orgánico no modifica la tensión superficial. Después de un mes de tratamiento los sistemas blanco regresan a la tensión superficial original como si no se le hubiera adicionado queroseno, como consecuencia de su evaporación. Sin embargo, los 15 tratamientos muestran una disminución de la tensión superficial, si sólo nos enfocamos en los tratamientos sin EL (debido a que su presencia disminuye la tensión superficial) podemos observar que están por debajo del valor de tensión esperado después de un mes de tratamiento, lo cual sugiere la posible formación de biosurfactantes por las diferentes microbiotas.

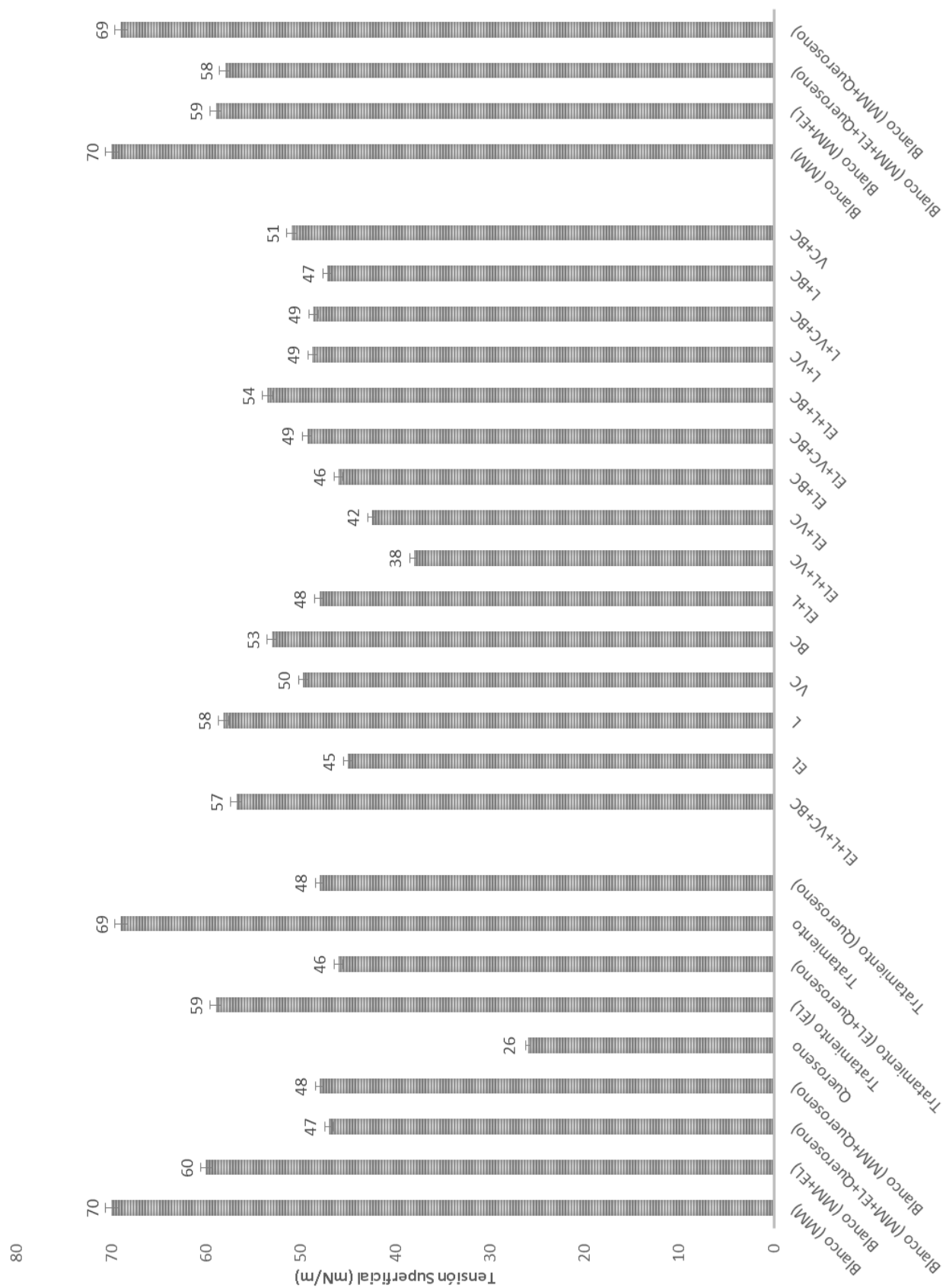


Figura 19. Variación de la tensión superficial en el tratamiento de las MHT

Con la finalidad de tener una idea del tipo de géneros y número de microorganismos presentes en un sistema se seleccionó aquel que tiene EL, VC, BC y L. Las **Figuras 20 y 21** muestran la morfología colonial de los microorganismos presentes en este sistema. Como podemos observar se aislaron alrededor de 40 microorganismos entre bacterias y hongos, con poblaciones de alrededor de 1×10^5 UFC/ml.



Figura 20. Bacterias del sistema compuesto por EL, VC, BC y L; población 89×10^5 , se identificaron 10 bacterias

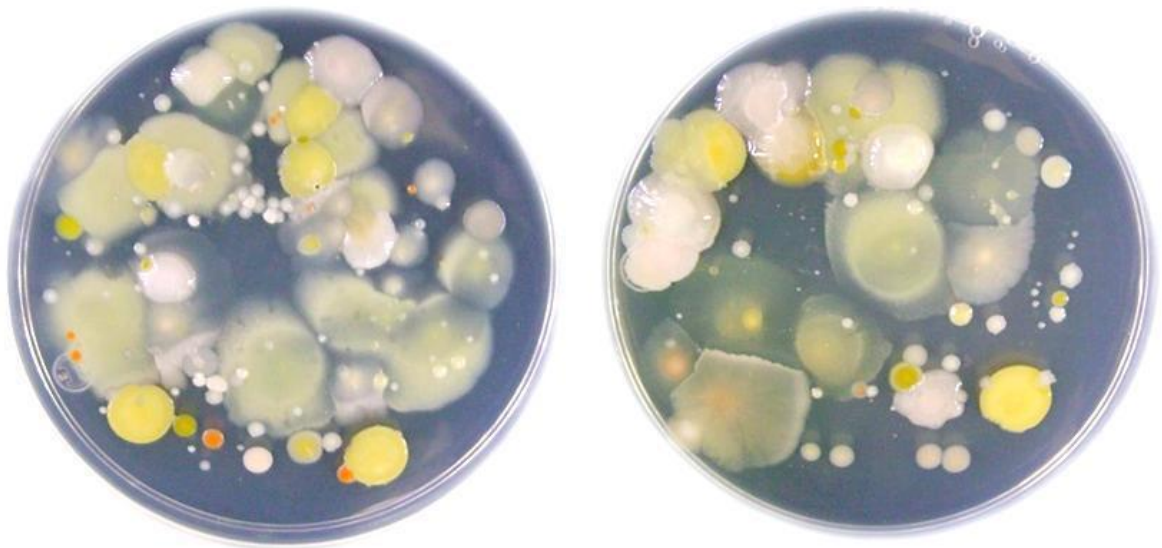


Figura 21. Levaduras y hongos del sistema compuesto por EL, VC, BC y L; población 88×10^5 , se identificaron 7 hongos.

7.1.3 Evaluación de la capacidad de remoción de HPA por mezclas de la MBT

La evaluación del efecto de bioestimar la microbiota nativa de cada soporte orgánico en estudio, mostró un efecto significativo en los niveles de remoción de los HPA; los resultados se muestran en la **Figura 22**. La bioestimulación de la flora microbiana de los materiales orgánicos tuvo un efecto positivo en la mayoría de los sistemas, incrementando los niveles de remoción hasta en un 50%. La presencia de la microbiota aportada por el extracto de leonardita favorece la remoción de los HPA, como se observa en las **Figuras 23 y 24**. Se aprecia un ligero efecto negativo por la presencia de la microbiota aportada por la lombriz, hecho que sucedió sin bioestimar el sistema también. La causa puede ser debida tanto a la microbiota de la lombriz como a compuestos liberados durante la maceración, entre los cuales se pueden encontrar enzimas e inclusive sistemas de defensa (glóbulos blancos, i.e. leucocitos) que pueden atacar a las diversas microbiotas atenuándolas. La bioestimulación de los materiales orgánicos implica un enriquecimiento microbiano por efecto del sustrato adicionado (caldo nutritivo), lo cual podría alterar la proporción de las cepas nativas y por consecuencia los niveles de remoción de HPA. La bioestimulación no garantiza el mejor funcionamiento de la flora microbiana desarrollada en los procesos de remoción de contaminantes, como se observa en los resultados obtenidos (**Figuras 15 y 22**).

Esto debido a que las microbiotas de los materiales orgánicos en principio se encuentran en sistemas cuya fuente de carbono es compleja por tratarse de estructuras aromáticas o poliméricas, por lo que al adicionarse una fuente de carbono más sencilla como lo es el caldo nutritivo, aquellas cepas en menor proporción se pueden ver favorecidas o estimuladas modificando su proporción respecto a las que sobreviven en ambientes más exigentes.

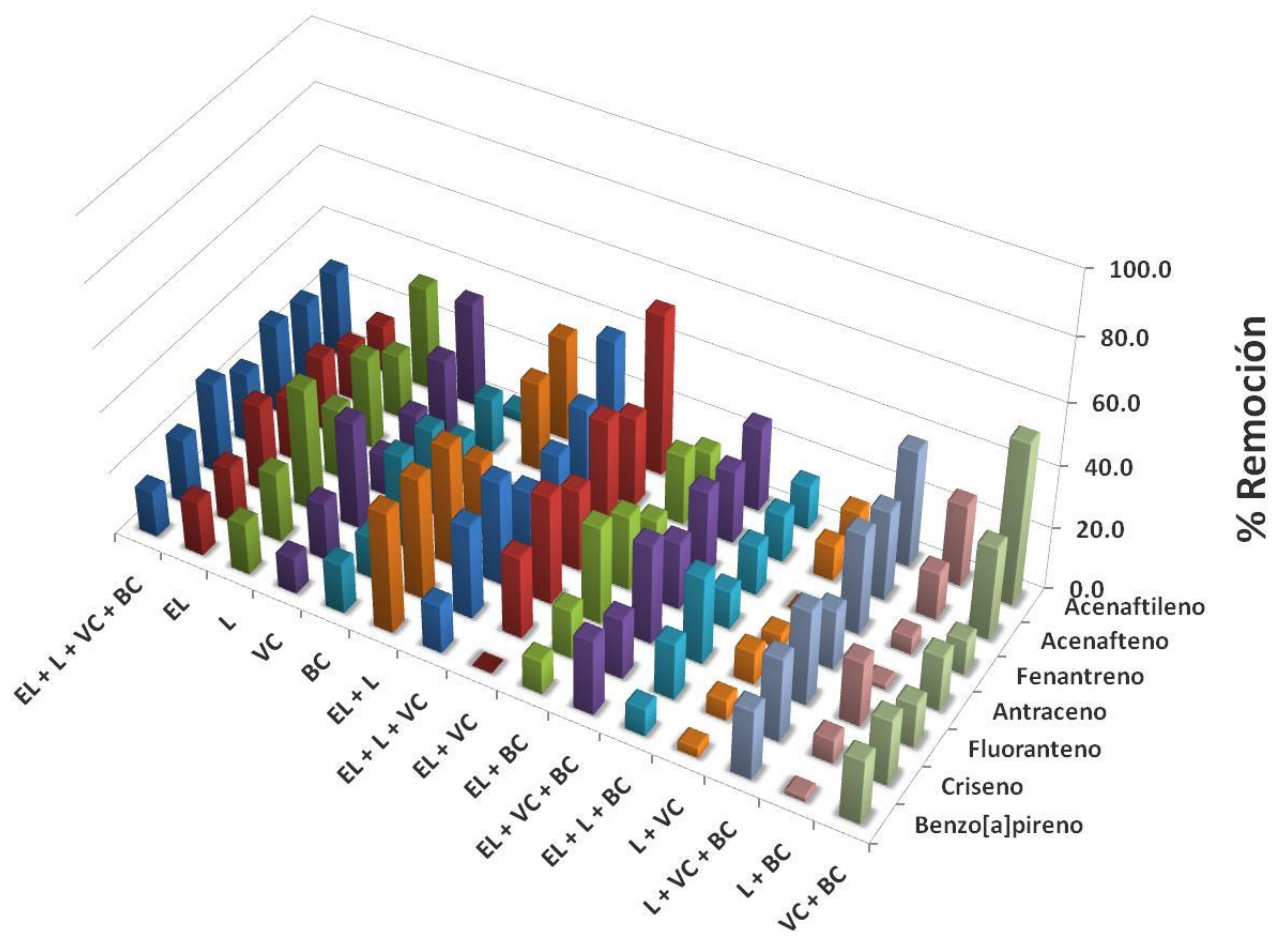


Figura 22. Porcentaje de remoción de HPA por la MT bioestimulada

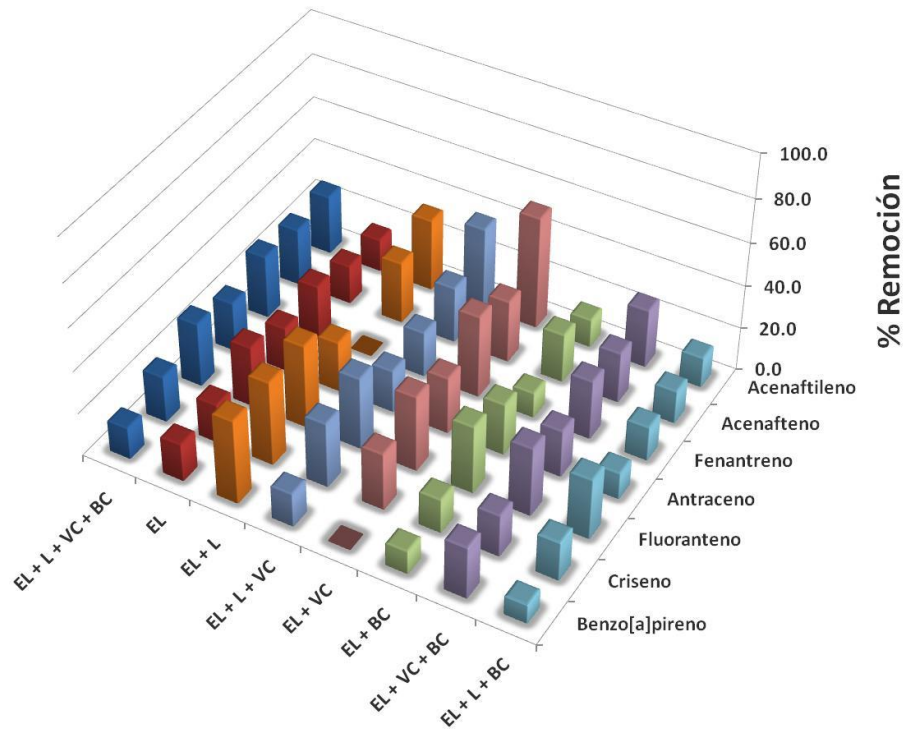


Figura 23. Porcentaje de remoción de HPA por la MT bioestimulada en presencia de EL (ácidos húmicos)

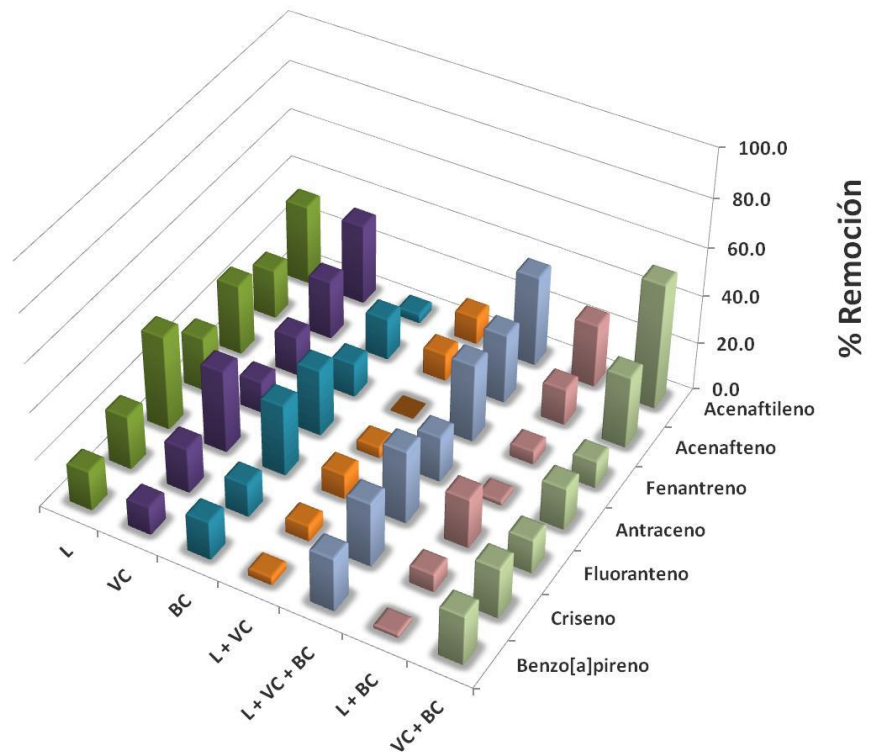


Figura 24. Porcentaje de remoción de HPA por la MT bioestimulada en ausencia de EL (ácidos húmicos)

7.1.4 Evaluación de la capacidad de remoción de HPA por mezclas de CM

Los microorganismos empleados para realizar los inóculos de los cultivos mixtos (CM) se muestran en la **Tabla 12**. Este estudio a diferencia del anterior, tuvo la finalidad de evaluar microbiotas hidrocarbonoclastas diseñadas con base en las cepas hidrocarbonoclastas aisladas y conservadas de forma axénica, de cada material orgánico en estudio.

Tabla 12. Microorganismos hidrocarbonoclastas empleados para formar los inóculos de la MHS

	EL	VC	L	BC	
Bacterias	20	31	25	24	100

EL: Extracto de leonardita; VC: Vermicomposta; L: Lombriz; BC: Bagacillo de caña

Es bien conocido que la biorremediación de los HPA y la velocidad de remoción depende de las condiciones ambientales, número y tipo de microorganismos, naturaleza y estructura química de los compuestos a ser degradados (**Rieser-Roberts, 1998**). El efecto de las condiciones de estado mencionadas anteriormente se observaron en los diferentes sistemas inoculados con las MHS provenientes de cada material orgánico. El contenido de microorganismos de los tratamientos comprendió entre 100 y 20 microorganismos hidrocarbonoclastas (solo bacterias). Como podemos observar en la **Figura 25**, los niveles de remoción de HPA en estudio fueron mayores en comparación con los sistemas constituidos por las MT o MBT.

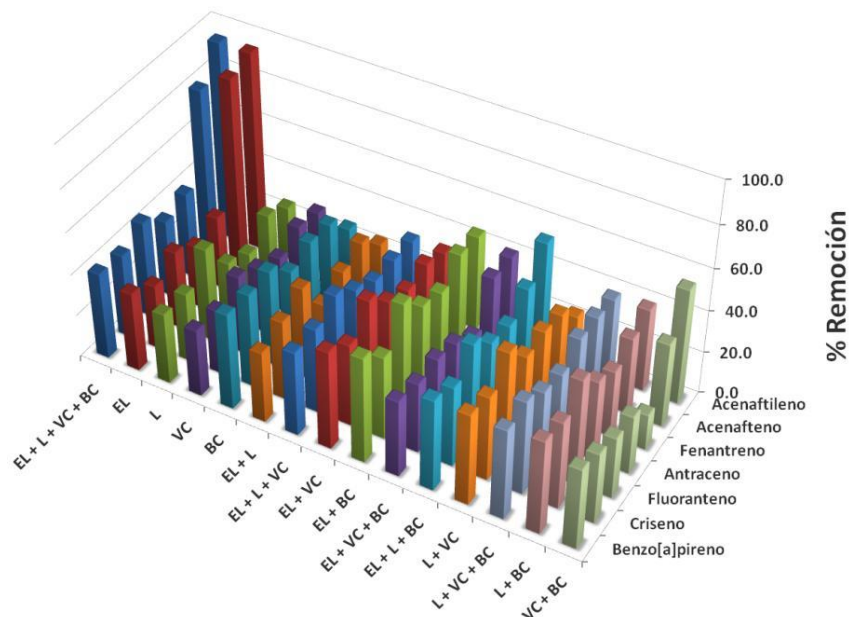


Figura 25. Porcentaje de remoción de HPA por CM

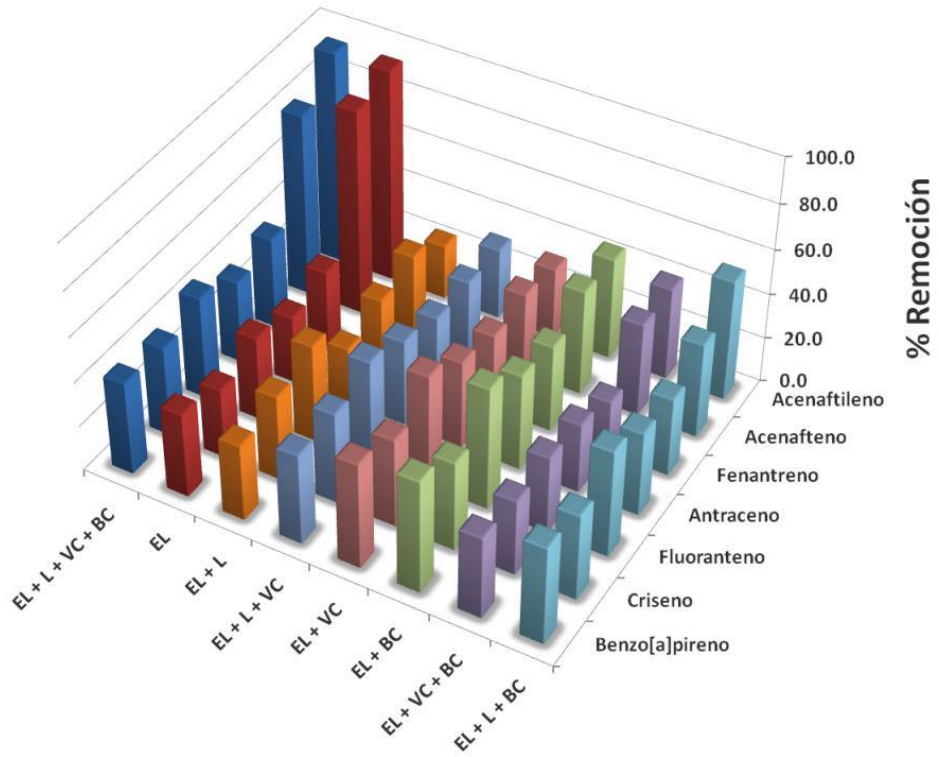


Figura 26. Porcentaje de remoción de HPA por el CM en presencia de la microbiota del EL

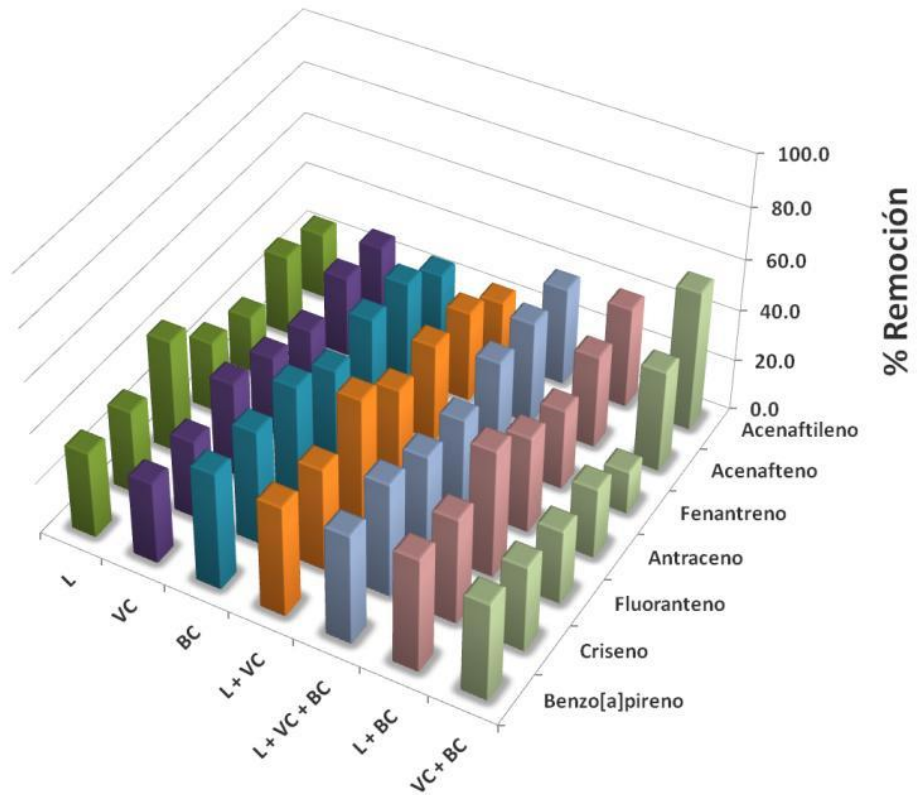


Figura 27. Porcentaje de remoción de HPA por el CM ausencia de la microbiota del EL

La habilidad para remover HPA por los diferentes cultivos mixtos fue determinada en medio mineral suplementado con una mezcla de HPA y **Queroseno**. La **Tabla 12** muestra el porcentaje de remoción de los HPA (sin considerar al acenaftileno y acenafteno; ya que nos enfocaremos a los HPA de mas de tres anillos) por todos los tratamientos preparados con los inóculos a prueba. Los cultivos mixtos individuales mostraron en general una remoción pobre mientras que los sistemas binarios y terciarios mostraron los mejores resultados. El promedio general del porcentaje de remoción de los HPA en presencia de Queroseno fue $36.7 \pm 1.5\%$. Los promedios de remoción para cada HPA fue: fenantreno, 31.8%; antraceno, 33.7%; fluoranteno, 43.1%; criseno, 34.6% y benzo[a]pireno, 40.2%. Los sistemas que estuvieron por encima de la media estan resaltados en la **Tabla 12**. La comparación de los porcentajes de remoción de HPA por todos los tratamientos muestra que los HPA de alto peso molecular (criseno y benzo[a]pireno) fueron preferencialmente removidos por los tratamientos constituidos con EL o BC. Aunque algunos sistemas fueron capaces de remover benzo[a]pireno por encima del 30% (VC; L; EL; EL+L; VC+BC; EL+VC+BC), su rendimiento fue pobre con estructuras menos complejas. El análisis estadístico de la comparación múltiple de medias de Duncan, Fisher's y Tukey-Kramer (**Tabla 13**) reveló que el sistema constituido por los cultivos mixtos de **EL+BC** tuvo el más alto porcentaje de remoción de HPA (antraceno, 42.2%; fluoranteno, 53.9%; criseno, 39.2% y benzo[a]pireno, 49.9%.) con excepción del fenantreno que fue del 38.2%.

Tabla 13. Remoción de HPA en presencia de Queroseno por los cultivos mixtos y sus mezclas de los materiales orgánicos

	Fenantreno	DS	AE	Antraceno	DS	AE	Fluoranteno	DS	AE	Criseno	DS	AE	Benzo[a]pireno	DS	AE
EL + L + VC + BC	40.2	1.5	a	36.4	0.1	c	45.3	1.5	c	35.6	0.5	b	40.8	0.5	d
EL	34.2	2.2	b	29.8	0.5	f	36.9	3.3	d	30.5	1.5	e	37.2	0.7	g
L	21.9	0.6	g	27.3	0.8	g	44.0	8.7	c	32.6	0.9	d	33.4	3.0	i
VC	25.6	2.7	e	30.6	2.3	e	36.7	2.4	d	30.6	2.0	e	31.6	2.1	j
BC	39.3	0.1	a	34.9	2.0	d	45.1	3.0	c	34.4	1.6	d	44.5	0.6	b
EL + L	30.6	2.8	d	24.8	0.3	h	43.1	0.4	c	36.5	1.1	b	33.4	1.1	i
EL + L + VC	32.0	0.6	c	37.8	0.1	b	45.7	1.7	c	35.0	0.3	c	39.7	0.3	e
EL + VC	33.5	2.3	b	38.3	0.4	b	49.3	0.7	b	35.7	0.1	b	45.4	1.5	b
EL + BC	38.2	2.7	a	42.2	1.5	a	53.9	0.2	a	39.2	0.3	a	49.9	0.9	a
EL + VC + BC	23.0	1.4	f	30.3	2.6	e	33.7	4.6	e	33.0	1.2	d	36.0	0.3	h
EL + L + BC	34.3	1.4	b	36.9	1.0	c	47.2	1.4	c	36.8	0.3	b	43.1	0.7	b
L + VC	37.8	3.1	a	36.7	0.8	c	49.8	1.6	b	35.8	0.1	b	43.1	1.3	b
L + VC + BC	38.7	5.8	a	34.5	1.0	d	37.4	2.4	d	34.3	2.2	d	42.7	0.5	c
L + BC	31.1	1.4	d	37.5	1.0	b	49.7	1.1	b	35.2	0.4	c	44.3	1.4	b
VC + BC	16.6	0.2	h	27.3	1.9	g	28.8	5.1	f	33.3	1.7	d	38.1	0.3	f

AE: Resultados del análisis estadístico por la prueba de comparación de medias múltiples de Duncan, Fisher (LSD) y Tukey-Kramer ($p < 0.05$). Las mismas letras indican ausencia de diferencia significativa.

De acuerdo con estos resultados, los cultivos mixtos de solo un material orgánico fueron menos efectivos que los tratamientos binarios y terciarios en la remoción de HPA. Los microorganismos que provienen de la VC parece que tienen un efecto negativo o una incompatibilidad, cuando se mezclan con otros cultivos mixtos de otro inóculos porque en algunas combinaciones (HA+EW+VC; VC+SCB) la remoción de PAH disminuye. El cultivo mixto de VC trabaja bien cuando es mezclado con L, posiblemente debido al origen en común de ambos materiales. Se comentó anteriormente el origen de la VC, lo cual puede explicar esta interacción favorable. Sin embargo; cuando VC interacciona en tratamientos terciarios este problema de "incompatibilidad" es menos evidente. Así mismo, al parecer existe una incompatibilidad entre VC y BC. Estos resultados pueden ser resultado del método de aislamiento empleando (Stach y Burns 2002) o la disminución en la eficacia de los degradadores de la comunidad nativa de los materiales orgánicos como son en este caso la VC y el BC (Zhou et al. 2008). Vacca et al. (2005) reportaron que modificando el procedimiento de enriquecimiento cambia los resultados del aislado final; es decir, el conjunto de microorganismos que conforman la microbiota. Cuando están presentes en mezclas, los HPA tienen la capacidad de influenciar la velocidad y el nivel de biodegradación de otros componentes de la mezcla. En algunos casos, estas interacciones pueden ser positivas, resultando en un incremento en la biodegradación de uno o más componentes (Bouchez et al. 1995, Beckles et al. 1998), mientras que en otros casos, efectos negativos han sido observados (Trzesicka-Mlynarz y Ward 1995).

Debido a que los HPA, como otras clases de compuestos de hidrocarburos, constituyen una serie de compuestos homólogos, las interacciones entre estos compuestos deben ser consideradas como características importantes en los procesos de biodegradación. Un parámetro muy importante a considerar es el cometabolismo. El cometabolismo es un fenómeno bien documentado en el caso de hidrocarburos (Horvath 1972, Perry 1979), el cual también ha sido reportado en el caso de los HPA (Walter et al. 1991, Weissenfels et al. 1991). El cometabolismo como es definido por Criddle (1993), consiste en la transformación de substratos que no favorecen el crecimiento de células en crecimiento en la presencia de un substrato de crecimiento, así como; células en no crecimiento en ausencia de un substrato de crecimiento en presencia de un substrato energético. En particular para los HPA, diversos casos de niveles de degradación altos por cometabolismo han sido reportados (Mueller et al. 1990,

[Walter et al. 1991](#), [Weissenfels et al. 1991](#)). La adición de queroseno como una fuente de inducción enzimática tuvo un efecto positivo en la remoción de HPA ([Tabla 16](#)).

El papel del queroseno en la remoción de HPA pudo ser debido al incremento de la biomasa microbiana ([Carmichael y Pfaender 1997](#)), una activación enzimática en particular ([Kanaly 2000](#)) o la biodisponibilidad del contaminante debido a una estimulación en la formación de biosurfactantes ([Ferraz et al. 2002](#)), como se hizo notar en este trabajo en los experimentos de tensión superficial de los tratamientos ([Figura 23](#)). [Kanaly and Bartha \(1999\)](#) indicaron que el cometabolismo microbiano de cuatro y cinco anillos aromáticos fue mejorado con la adición de fracciones ligeras tipo gasolina.

Considerando las observaciones realizadas por [Coleman et al. \(1984\)](#), quienes determinaron que los mayores constituyentes del queroseno son alcanos y cicloalcanos (68.6%); benceno y benceno sustituido (13.7%); así como, naftaleno y naftaleno sustituido (5.7%), componentes también presentes en el queroseno. Otras fuentes indican que el Fuel Oil No. 1 (conocido como queroseno) usualmente contiene 10 a 16 átomos de carbono por molécula, con un promedio de 12. La composición química promedio en peso es de 35% parafinas, 60% naftalenos y 15% de aromáticos. Los resultados encontrados en nuestro estudio, por tanto, son coherentes con los estudios que demuestran que la presencia de fracciones ligeras incrementan los niveles de remoción de los HPA.

Así mismo, el incremento en la velocidad de remoción de HPA en presencia de un sustrato de crecimiento ha sido frecuentemente observado y atribuido al cometabolismo ([Yuan et al. 2000](#), [Dean-Ross et al. 2002](#)). [Trzesicka-Mlynartz y Ward \(1995\)](#) mostró que la mezcla de cuatro bacterias degradadoras diferentes de fluoranteno, fueron más efectivas en la degradación de mezclas de HPA que un aislado individual, y propuso que los intermediarios producidos por otros miembros del consorcio podrían facilitar la remoción total de los HPA. En este estudio, todos los cultivos mixtos fueron capaces de remover los HPA, aunque el intervalo de los compuestos removidos simultáneamente varió marcadamente entre éstos. Estos resultados sugieren que no sólo diferentes consorcios tienen diferentes capacidades de remover varios HPA, sino que también el papel de cada aislado en el consorcio puede variar.

[Civilini \(1994\)](#) analizó un sistema con un consorcio con resultados similares a este trabajo pero además indicó los niveles de evaporación de HPA de un 10% para hidrocarburos comprendidos entre

tres y cuatro anillos, con excepción de los hidrocarburos de dos anillos para los cuales detectaron evaporación de 54%. Los niveles de evaporación de HPA que observamos en nuestros sistemas se muestran en la [Tabla 14](#).

Tabla 14. Evaporación promedio de HPA en los sistemas en estudio.

% Remoción por evaporación	
Acenaftileno	67 ± 1.7
Acenafteno	57 ± 2.6
Fenantreno	46 ± 1.2
Antraceno	22 ± 1.3
Fluoranteno	35 ± 1.8
Criseno	18 ± 0.7
Benzo[a]pireno	22 ± 0.9

Los niveles de remoción por evaporación son semejantes a los estudios del investigador [Civilini](#). Pese a esta pérdida de evaporación se obtuvieron niveles de remoción comparables con otros estudios. La mayor cantidad de cepas hidrocarbonoclastas presentes no necesariamente incrementa el nivel de remoción de HPA, como podemos observar en las [Figuras 28 a 34](#).

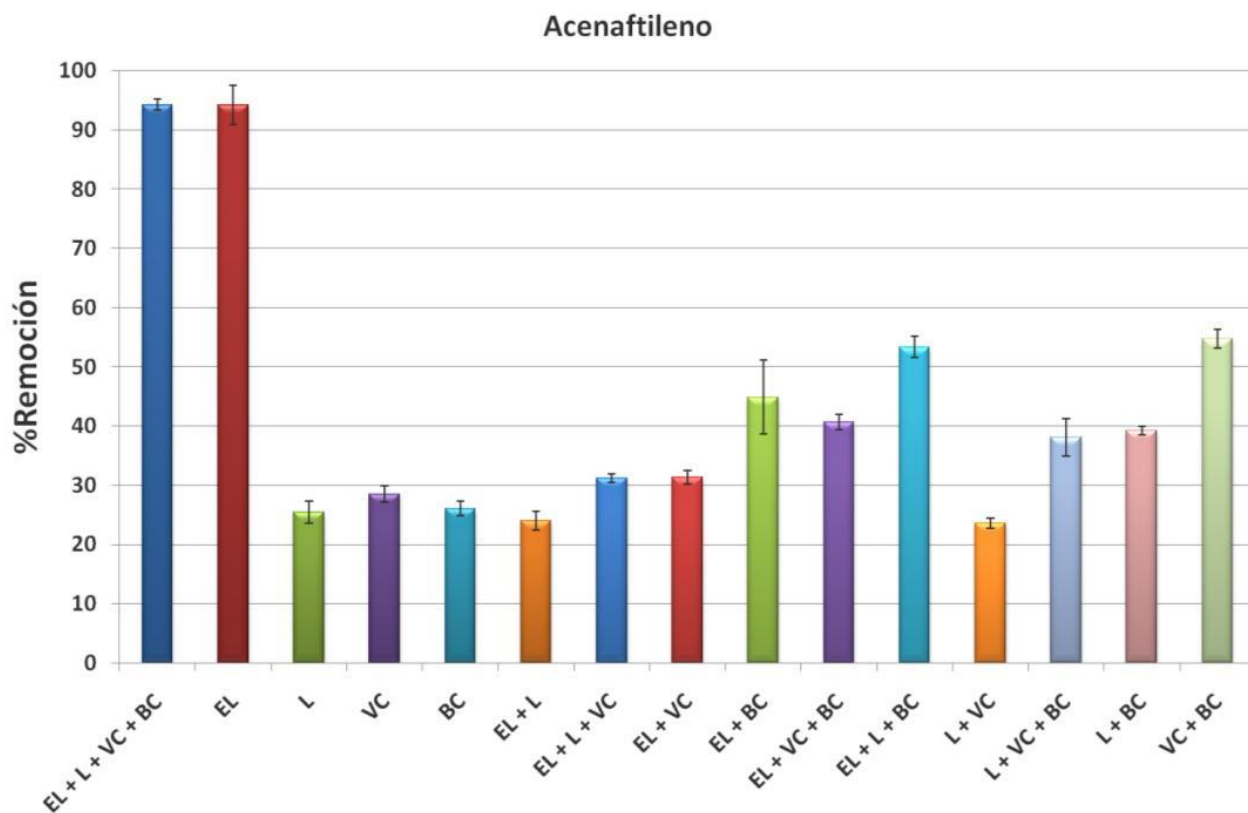


Figura 28. Porcentaje de remoción de Acenaftileno por las MHS

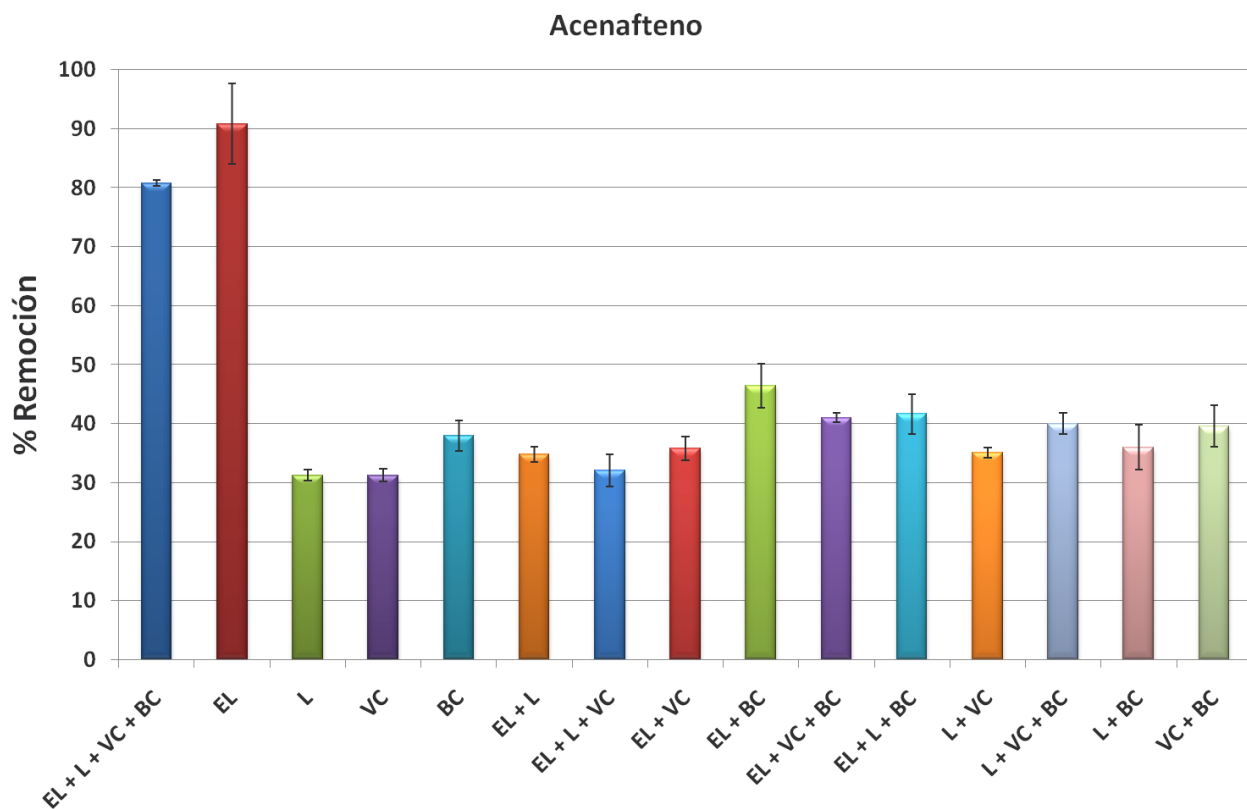


Figura 29. Porcentaje de remoción de Acenafteno por las MHS

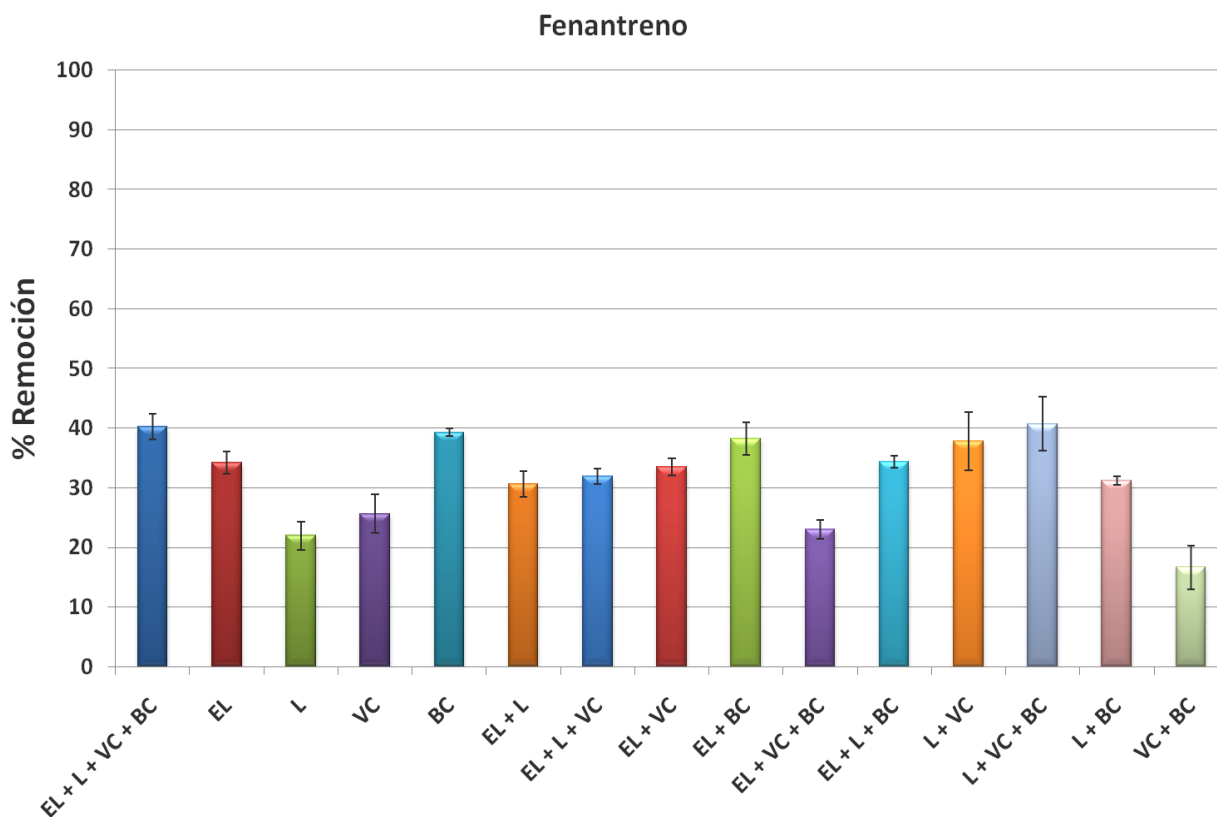


Figura 30. Porcentaje de remoción de Fenantreno por las MHS

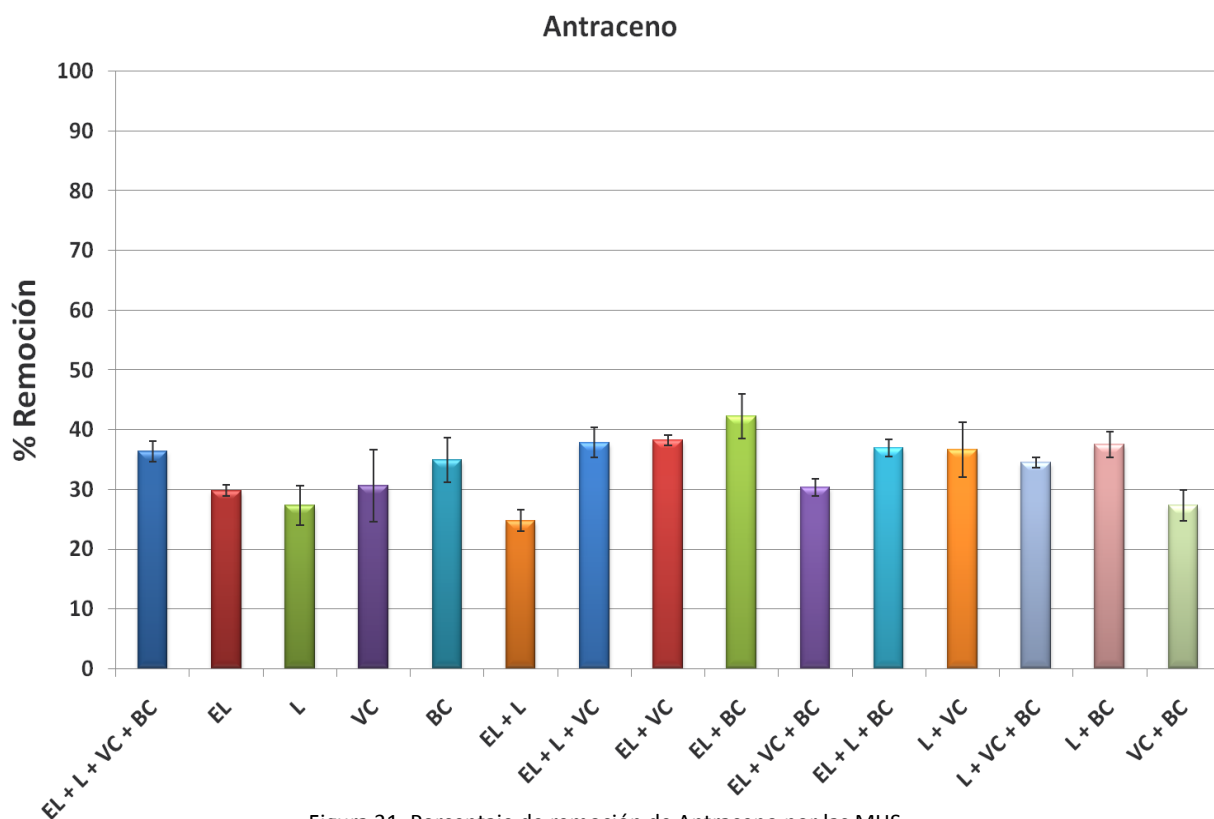


Figura 31. Porcentaje de remoción de Antraceno por las MHS

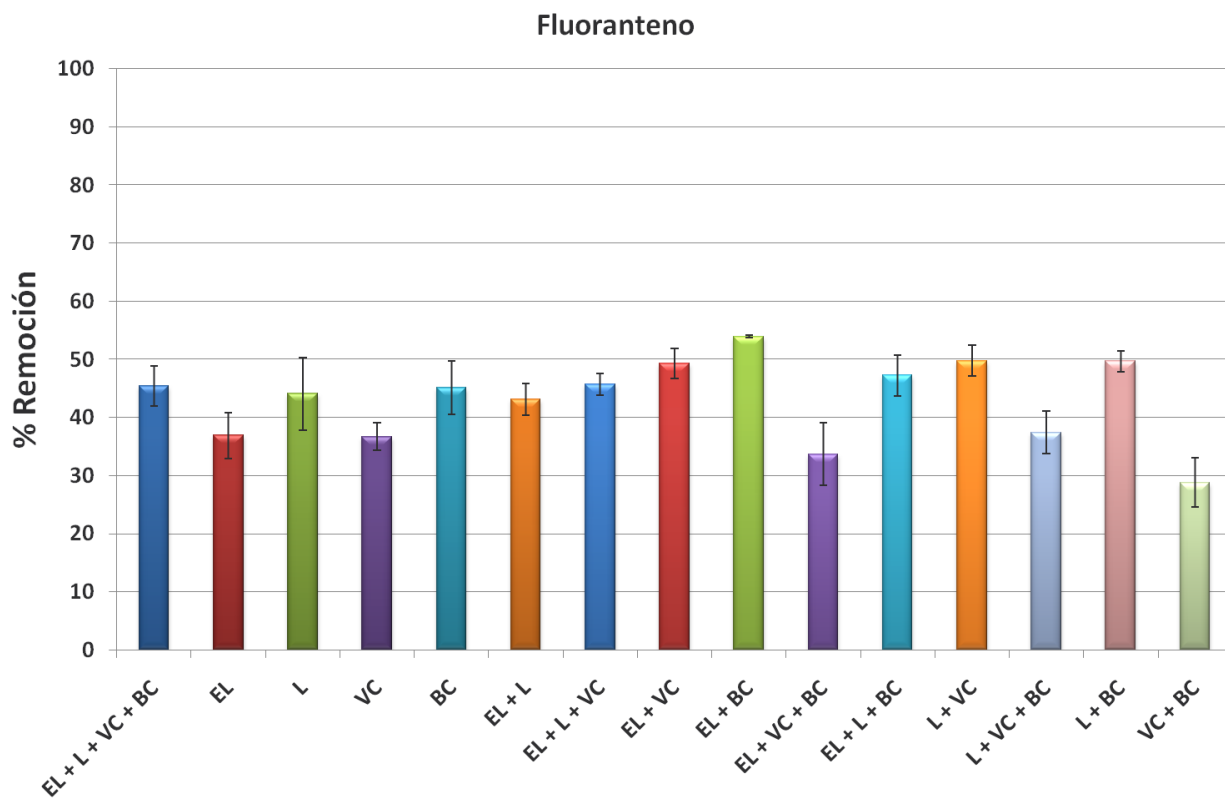


Figura 32. Porcentaje de remoción de Fluoranteno por las MHS

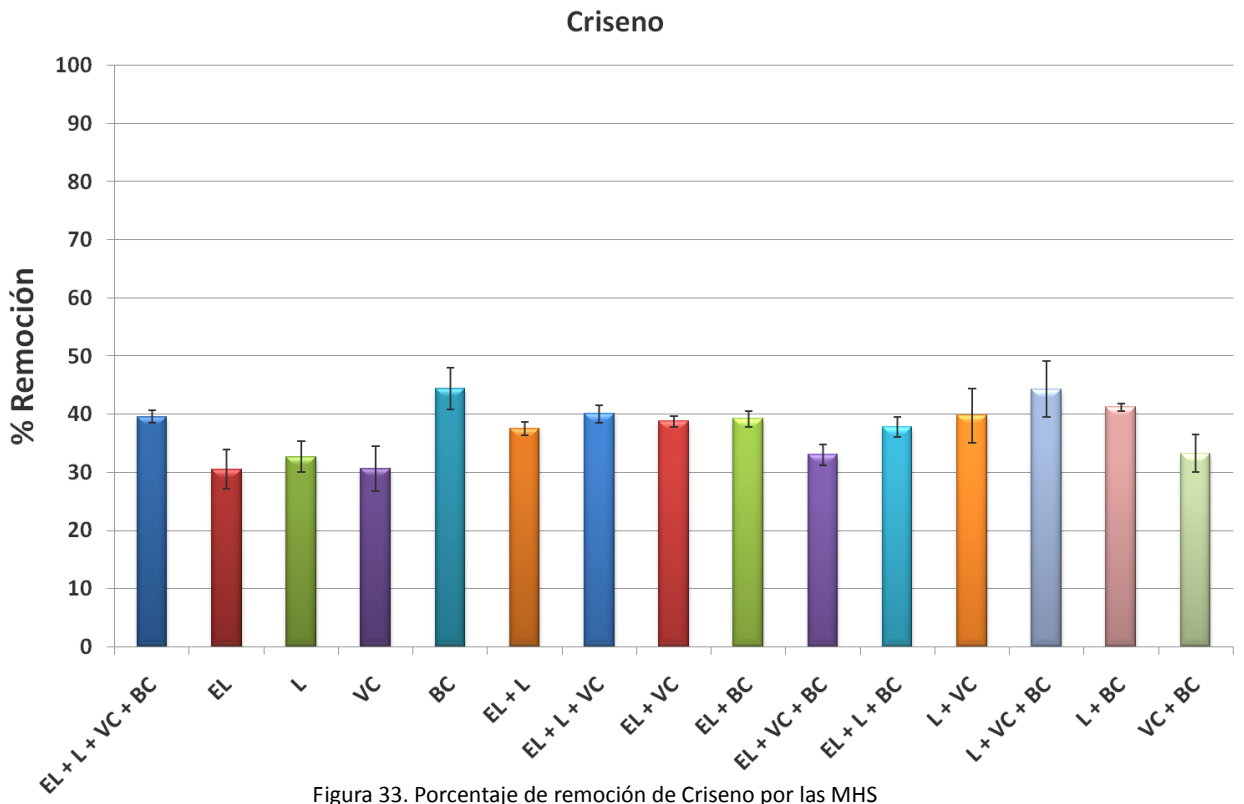


Figura 33. Porcentaje de remoción de Criseno por las MHS

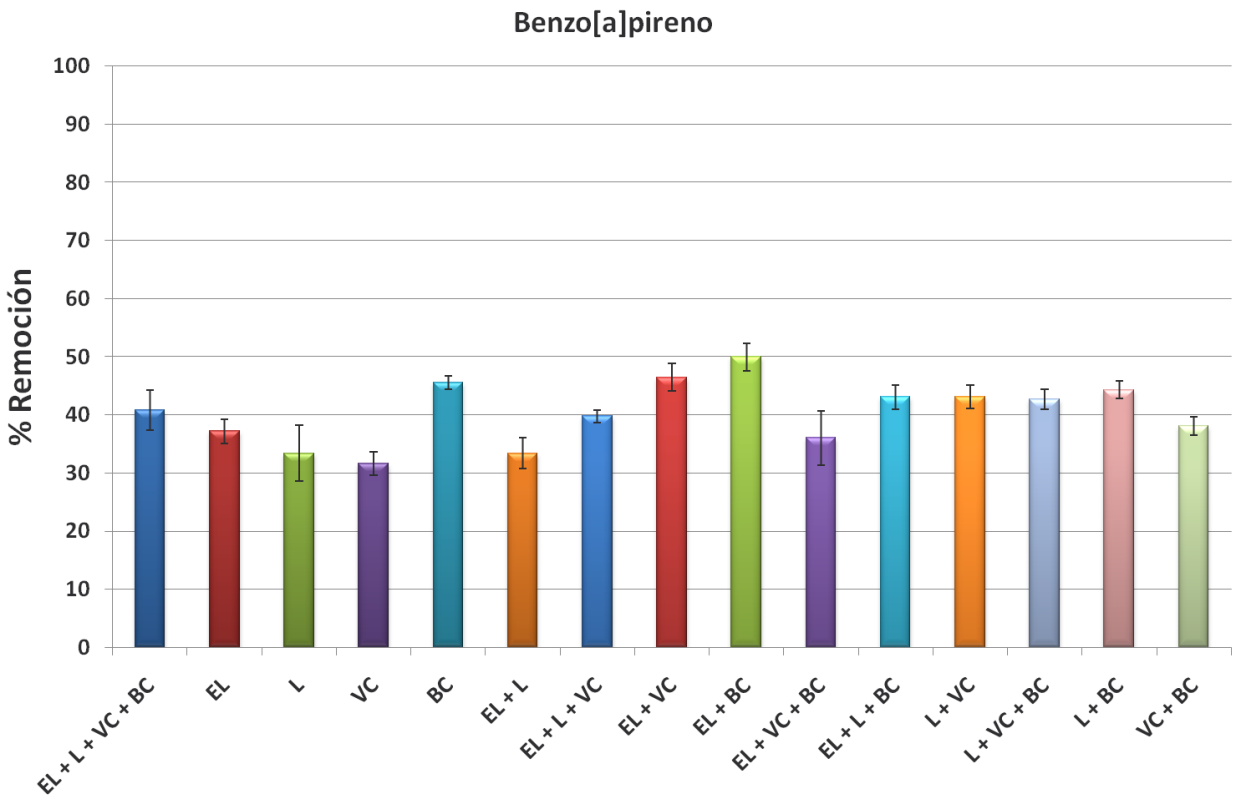


Figura 34. Porcentaje de remoción de Benzo[a]pireno por las MHS

7.2 Etapa 2

7.2.1 Identificación de los microorganismos del CM

Se realizó el análisis de los microorganismos aislados de los materiales bagacillo de caña y extracto de leonardita por ser la mezcla de micrbiotas que mayor nivel de remoción de HPA presentó, de esta manera se construyó su árbol filogenético (**Figura 35**). La **Tabla 15** muestra el filo, géneros y la capacidad de crecer en presencia de HPA de las 44 bacterias aisladas de la EL y BC e identificadas por métodos de biología molecular. La secuencia parcial del gen 16S rDNA muestra similitudes del 95,4% al 100% para 38 cepas, las seis cepas residuales fueron identificados sólo por el grupo. El número relativo de las cepas (EL / BC), con base en el filum, fue el siguiente: Actinobacteria, 12/8; Firmicutes, 5/2; Proteobacteria, 1/14. De acuerdo con la literatura, la mayoría de los filum de bacterias identificadas han sido aisladas de suelos y juegan un papel importante en la degradación de los materiales orgánicos (**Dworkin 2006**). Por otra parte, las proporciones de los filum están de acuerdo con las características de los materiales orgánicos en cuestión.

Actinobacteria, por ejemplo, repone el suministro de nutrientes en el suelo y está implicado en la formación de humus (**Barragán et al. 2008**). Las proteobacterias son más abundantes en los suelos (rizosfera) y también cuando está disponible una mayor concentración de carbono orgánico (**Fierer et al. 2007**). Los porcentajes de los filum que pertenece a cada material se muestran en las tablas mencionadas.

Una amplia variedad de bacterias hidrocarbonoclastas han sido aisladas de suelos contaminados, y aunque algunos estudios han demostrado que, los suelos contaminados con petróleo están dominadas por las bacterias Gram negativas (**Kaplan y Kitts 2004**), en este trabajo 26 de las 44 bacterias identificadas fueron Gram positivas. Según **Gontang et al. (2007)**, las bacterias Gram positivas puede dividirse en dos subdivisiones principales, el filum Actinobacteria (alto contenido de G + C) y el filum Firmicutes (bajo contenido de G + C). Entre los géneros del filum Actinobacteria encontramos *Gordonia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium* y *Arthrobacter* los cuales son bien conocidos por ser altamente eficaces para eliminar hidrocarburos.

En este trabajo, las 26 bacterias Gram positivas crecieron en presencia de los HPA seleccionados cuando se añadieron en una concentración de 100 mg / kg cada uno. Teniendo en cuenta la distancia radial desde el centro de la placa Petri y el ancho de la inoculación por estría abierta, 25 crecieron en un 100%, 15 un 50% y 4 por debajo del 25% (Tabla 15). Es interesante observar que la mayoría de las bacterias Gram positivas (12 de 26 cepas) fueron aisladas del EL y la mayoría de las bacterias Gram negativas (15 de 16 cepas) de la BC.

La degradación microbiana de hidrocarburos de petróleo en una corriente tropical contaminada en Lagos, Nigeria fue reportada por Adebuseye et al. (2007). Nueve cepas bacterianas, *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Acinetobacter iwoffii*, *Flavobacterium sp.*, *Micrococcus roseus*, y *Corynebacterium sp.* fueron aisladas de la corriente contaminada, las cuales podrían degradar el petróleo crudo. En otro estudio, géneros de bacterias, como, *Gordonia*, *Brevibacterium*, *Aeromicrobium*, *Dietzia*, *Burkholderia* y *Mycobacterium* fueron aisladas de suelo contaminado con petróleo resultaron ser conocidas en la degradación de hidrocarburos (Chaillan et al. 2004). La degradación de los hidrocarburos poliaromáticos por *Sphingomonas* fue reportada por Daugulis y McCracken (2003). Algunos estudios han demostrado que el género Actinobacteria puede albergar genes para la degradación de múltiples hidrocarburos alifáticos y aromáticos (van Beilen y Funhoff 2007) y puede ser que los géneros aislados en este estudio tengan estas capacidades catabólicas como se muestra por la remoción de los hidrocarburos.

La mayor parte de los microorganismos identificados en este trabajo fueron de género Actinobacteria (Tabla 15); su capacidad para consumir hidrocarburos como única fuente de carbono ha sido previamente reportada (Goodfellow 1983). *Gordonia*, *Mycobacterium* y *Rhodococcus* son altamente eficientes en la remoción de hidrocarburos; así como, *Brevibacterium*, *Dietzia*, *Kocuria* y *Streptomyces*. Ellos también presentan interesantes características que pueden ser útiles en la remoción de hidrocarburos bajo condiciones extremas. Algunas características de estos géneros son las siguientes: (1) *Gordonia* es capaz de sintetizar surfactantes y micobactinas, que son elementos queladores de hierro que le permiten desarrollarse en ausencia de éste; (2) *Mycobacterium*, resiste periodos prolongados en condiciones extremas de no crecimiento; lo cual puede explicar su habilidad de sintetizar micobactinas y exoquelinas; (3) *Rhodococcus*, que está involucrado en la formación de humus y que es capaz de moverse en el suelo por sí mismo y cambiar su fisiología de Gram positivo a

Gram negativo; (4) *Brevibacterium* produce bioemulsificantes útiles con los cuales mejora la degradación de hidrocarburos en el ambiente; (5) *Streptomyces* es altamente resistente a los ambientes secos y con carencia de nutrientes, no requiere de una fuente de nitrógeno o vitaminas para crecer, puede usar quitina como fuente de carbono y nitrógeno. Estas características son importantes porque el EL y el BC, son materiales muy secos y contienen pocos nutrientes como para mantener un crecimiento microbiano elevado (Dworkin 2006).

El género *Bacillus* fue la única cepa del Filum Firmicutes identificado en este trabajo. Este género puede ser encontrado casi en cualquier parte; aunque, es difícil categorizar este género bacteriano o generalizarlo. El rango de los estilos de vida fisiológicos de este género es impresionante: son degradadores de la mayoría de la fuente de substratos derivados de plantas y animales incluyendo celulosa, almidón, proteínas, agar, hidrocarburos entre otros; son productores de antibióticos, nitrificantes heterotróficos, desnitrificantes, fijadores de nitrógeno, precipitadores de hierro, oxidantes de selenio, oxidantes y reductores de manganeso, quimiolitótrofos facultativos, acidófilos, alcalófilos, psicrófilos y termófilos. Una característica que los identifica es la formación de endosporas, razón por la cual se pudo aislar de ambos materiales orgánicos en estudio (Dworkin 2006).

Delftia, *Naxibacter*, *Rhizobium* y *Stenotrophomonas* pertenecen al Filum de Proteobacterias, y algunas especies remueven compuestos aromáticos policíclicos; además muestran características de interés adicionales para su empleo en la biorremediación de suelo contaminado. *Delftia*, es resistente a metales pesados y por lo tanto es recomendado su uso en la biorremediación de suelos co-contaminados. *Naxibacter* es capaz de crecer en medios muy simples y sintéticos; al mismo tiempo que son capaces de sintetizar y acumular gránulos de material de reserva de carbono (poli-P-hidroxitirato; PHB). Las especies con esta capacidad de acumular PHB pueden emplear el polímero intracelular cuando es necesario. *Rhizobium* es un fijador de nitrógeno simbiótico, el cual puede ser encontrado en raíces de plantas en especial en leguminosas. Así, dadas las características de las bacterias aisladas en este trabajo, estas pueden ser empleadas exitosamente en la biorremediación por bioaumentación de suelos co-contaminados con hidrocarburos, metales y aún pesticidas.

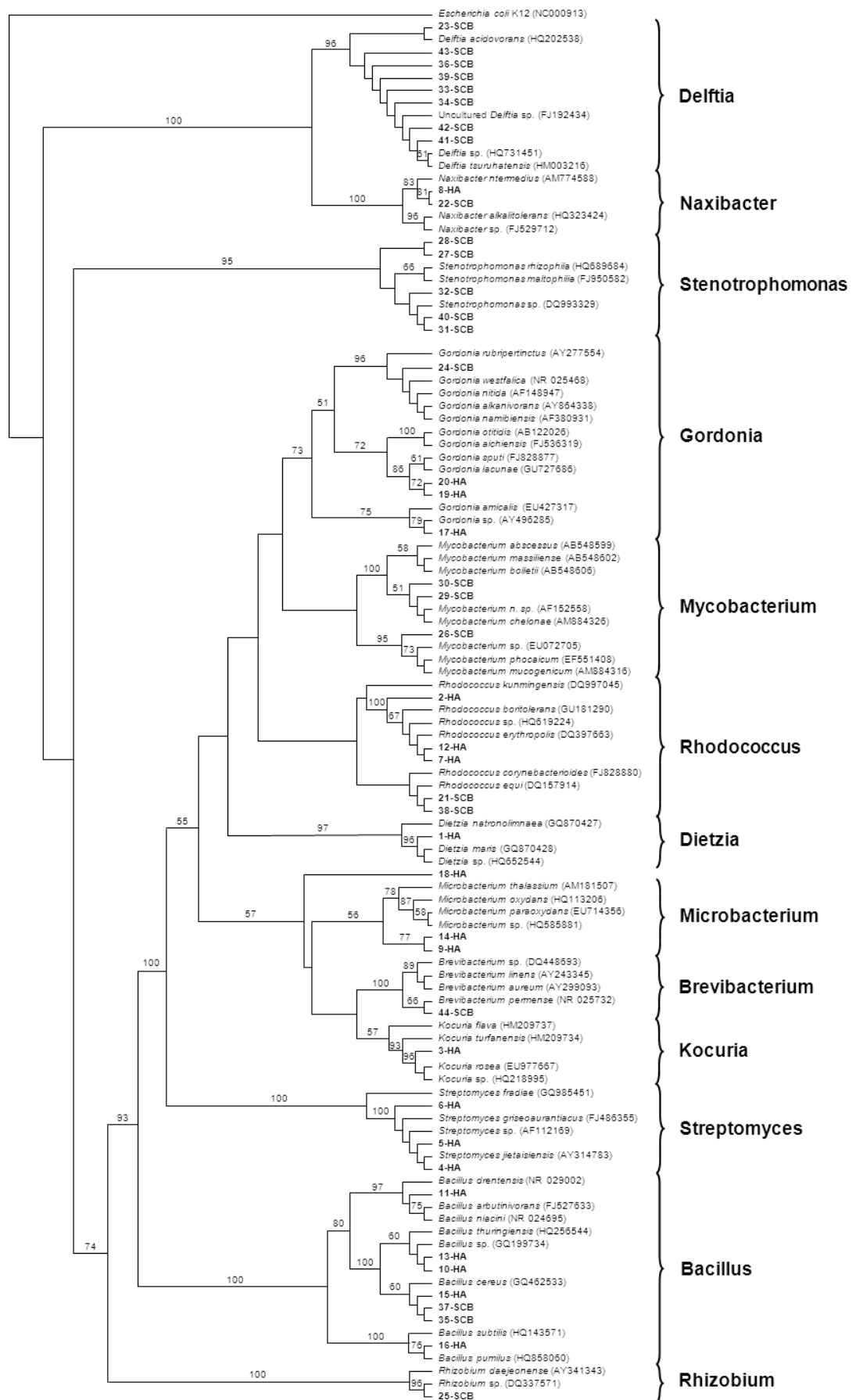


Figura 35. Árbol de máxima probabilidad (-lnL=5550.1084) de los microorganismos aislados de ácidos húmicos y de bagacillo de caña. La secuencia 16S R DNA de *E. coli* fue usada como grupo externo. Los valores de apoyo del Bootstrap están indicados para nodos $\geq 50\%$

Tabla 15. Números de acceso asignados por el GenBank, la asignación taxonómica y el genotipo de las secuencias generadas en este estudio.

Aislado	Especies más relacionadas en el GenBank (Accession no.)	Similitud (%) ^a	Taxon ^b (Accession no.)	Filum	Crecimiento en presencia de HPA
Bacillus					
10-EL	<i>Bacillus</i> sp. (GQ199734) <i>Bacillusthuringiensis</i> (HQ256544) <i>Bacillusdrentensis</i> (NR 029002)	100	<i>Bacillus</i> sp.	F	±
11-EL	<i>Bacillusniacini</i> (NR 024695)	99.1	<i>Bacillus</i> sp.	F	+
13-EL	<i>Bacillus</i> sp. (GQ199734) <i>Bacillusthuringiensis</i> (HQ256544)	99.8	<i>Bacillus</i> sp.	F	+
15-EL	<i>Bacillus cereus</i> (GQ462533) <i>Bacillusdrentensis</i> (NR 029002)	100	<i>Bacillus</i> sp.	F	±
16-EL	<i>Bacillusniacini</i> (NR 024695)	95.2	<i>Bacillus</i> sp.	F	±
35-BC	<i>Bacillus cereus</i> (GQ462533)	97.8	<i>Bacillus</i> sp.	F	+
37-BC	<i>Bacillus</i> sp. (GQ199734) <i>Bacillusthuringiensis</i> (HQ256544) <i>Bacillus cereus</i> (GQ462533)	99.8	<i>Bacillus</i> sp.	F	+
Brevibacterium					
44-BC	<i>Brevibacterium</i> sp. (DQ448693) <i>Brevibacteriumaureum</i> (AY243345) <i>Brevibacteriumlinens</i> (AY243345)	99.8	<i>Brevibacterium</i> sp.	A	±
Delftia					
33-BC	<i>Delftia</i> sp. (HQ731451) <i>Delftiaacidovorans</i> (HQ202538) <i>Delftiatsuruhatensis</i> (HM003216)	99.8	<i>Delftia</i> sp.	β-P	—
34-BC	"	99.8	<i>Delftia</i> sp.	β-P	—
36-BC	"	99.8	<i>Delftia</i> sp.	β-P	+
39-BC	"	99.8	<i>Delftia</i> sp.	β-P	+
41-BC	"	99.6	<i>Delftia</i> sp.	β-P	+
42-BC	"	99.3	<i>Delftia</i> sp.	β-P	+
43-BC	"	99.8	<i>Delftia</i> sp.	β-P	—
Dietzia					
1-EL	<i>Dietzia</i> sp. (HQ652544) <i>Dietzia maris</i> (GQ870428)	100	<i>Dietzia</i> sp.	A	+
Gordonia					
19-EL	<i>Gordonia lacunae</i> (GU727686)	98.2	<i>Gordonia</i> sp.	A	+
20-EL	"	99.8	<i>Gordonia</i> sp.	A	±
24-BC	<i>Gordonianamibiensis</i> (AF3880931) <i>Gordoniaalkanivorans</i> (AY864338) <i>Gordoniawestfalica</i> (NR 025468)	100	<i>Gordonia</i> sp.	A	+
Kocuria					
3-EL	<i>Kocuria</i> sp. (HQ218995) <i>Kocuria rosea</i> (EU977667)	100	<i>Kocuria</i> sp.	A	+

Aislado	Especies más relacionadas en el GenBank (Accession no.)	Similitud (%) ^a	Taxon ^b (Accession no.)	Filum	Crecimiento en presencia de HPA
<i>Mycobacterium</i>					
26-BC	<i>Mycobacterium bolletii</i> (AB548606) <i>Mycobacterium massiliense</i> (AB548602) <i>Mycobacterium abscessus</i> (AB548599)	95.4	<i>Mycobacterium</i>	A	±
29-BC	<i>Mycobacterium chelonae</i> (AM884326) <i>Mycobacterium</i> n. sp. (AF152558)	100	<i>Mycobacterium</i> sp.	A	±
30-BC	"	99.6	<i>Mycobacterium</i> sp.	A	±
<i>Naxibacter</i>					
8-EL	<i>Naxibacter</i> sp. (FJ529712)	99.1	<i>Naxibacter</i> sp.	β-P	±
22-BC	"	96.9	<i>Naxibacter</i>	β-P	+
<i>Rhizobium</i>					
25-BC	<i>Rhizobium</i> sp. (DQ337571)	100	<i>Rhizobium</i> sp.	α-P	+
<i>Rhodococcus</i>					
2-EL	<i>Rhodococcus kunmingensis</i> (DQ997045) <i>Rhodococcus</i> sp. (HQ619224)	96.5	<i>Rhodococcus</i>	A	+
7-EL	<i>Rhodococcus erythropolis</i> (DQ397663) <i>Rhodococcus boritolerans</i> (GU181290)	100	<i>Rhodococcus</i> sp.	A	+
12-EL	"	100	<i>Rhodococcus</i> sp.	A	+
38-BC	<i>Rhodococcus equi</i> (DQ157914)	99.6	<i>Rhodococcus</i> sp.	A	+
<i>Stenotrophomonas</i>					
27-BC	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (DQ993329)	99.3	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	γ-P	+
28-BC	"	98.2	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	γ-P	±
31-BC	"	100	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	γ-P	+
32-BC	"	99.8	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	γ-P	—
40-BC	"	100	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	γ-P	±
<i>Streptomyces</i>					
4-EL	<i>Streptomyces</i> sp. (AF112169) <i>Streptomyces griseoaurantiacus</i> (FJ486355)	100	<i>Streptomyces</i> sp.	A	+
5-EL	"	99.1	<i>Streptomyces</i> sp.	A	±
6-EL	"	100	<i>Streptomyces</i> sp.	A	±
9-EL		80	<i>Actinomycetales</i>	A	+
17-EL		80	<i>Actinomycetales</i>	A	±
21-BC		80	<i>Actinomycetales</i>	A	+
23-BC		80	<i>Burkholderiales</i>	β-P	+
14-EL		< 70	Bacteria		+
18-EL		< 70	Bacteria		±

7.2.2 Remoción de HPA como única fuente de carbono

Este estudio fue realizado con el inóculo de los cultivos mixtos pertenecientes a EL + BC, el cual mostró el mejor rendimiento en la remoción de HPA en presencia de queroseno. Este tratamiento removió los HPA seleccionados en porcentajes de: fenantreno, 29.4%; antraceno, 28.5%; fluoranteno, 34.4%; criseno, 20.5% y benzo[a]pireno, 23.6% (**Tabla 16**). El presente estudio confirma la habilidad de las bacterias puras aisladas de los materiales mencionados previamente y sus mezclas en la remoción de HPA. Organismos individuales pueden metabolizar sólo un intervalo limitado de substratos, aunque es conocido que el acoplamiento de diferentes especies bacterianas con una mayor capacidad enzimática, tienen mayor capacidad de degradar mezclas de HPA (**Mueller et al. 1989, Ellis et al. 1991, Trzesicka-Mlynarz y Ward 1995**), como ocurrió en todos los tratamientos en este trabajo.

La eficiencia de remoción de HPA por los microorganismos aislados de estos materiales orgánicos fue asociada a factores diferentes pero cercanamente relacionados como la capacidad de consumir HPA como única fuente de carbono (de acuerdo a los resultados obtenidos), las interacciones microbianas (mencionadas en las secciones anteriores) y la composición de la mezcla de HPA. Aunque, el sistema EL + BC fue efectivo en la remoción de cuatro (antraceno, fluoranteno, criseno y benzo[a]pireno) de los cinco HPA, el análisis estadístico no mostró diferencia significativa contra otros tratamientos.

Este inóculo (constituido por las microbiotas del EL + BC) consistió de 44 microorganismos de los cuales 40 fueron capaces de crecer en presencia de HPA (**Tabla 11**). Se observó un efecto negativo en el proceso de remoción cuando el Queroseno estuvo ausente. La ausencia de Queroseno disminuyó el porcentaje de remoción en 29.4%, 28.5%, 34.4%, 20.5% y 23.6% para el fenantreno, antraceno, fluoranteno, criseno y benzo[a]pireno respectivamente como se muestra en la **Tabla 16**.

Tabla 16. Efecto del Queroseno en la remoción de HPA por el tratamiento BC + EL

	Con Queroseno	Sin Queroseno
	% Remoción	% Remoción
Fenantreno	38.2 ± 2.7	29.4 ± 2.5
Antraceno	42.2 ± 1.5	28.5 ± 1.2
Fluoranteno	53.9 ± 0.2	34.4 ± 1.1
Criseno	39.2 ± 0.3	20.5 ± 2.1
Benzo[a]pireno	49.9 ± 0.9	23.6 ± 1.0

Cuando el cometabolismo ocurre, un producto secundario u otra molécula puede causar inhibición o acumulación de productos finales tóxicos (Barbieri et al. 1993). Por ejemplo, Kanaly y Bartha (1999) observaron un incremento en la biodegradación de hidrocarburos de 5 anillos aromáticos ([7-14C] benzo[a]pireno, a 80 mg/kg) cuando este fue mezclado con hidrocarburos individuales, mezclas de hidrocarburos definidas o fracciones de petróleo. Mc Nally et al. (1999) observó inhibición en la remoción de pireno en presencia de fenantreno mientras que un incremento en la remoción de antraceno y fenantreno fue observada cuando fenantreno y antraceno estuvieron presentes simultáneamente (Yuan et al. 2000). Stringfellow y Aitken (1995) encontraron inhibición competitiva en la degradación de fenantreno debido a la presencia de naftaleno, metilnaftaleno y fluoreno en mezclas binarias usando dos cultivos puros. Ellos concluyeron que la frecuencia de la inhibición competitiva observada con dos especies diferentes de pseudomonas puede ser común entre organismos degradadores de HPA. La presencia de fenantreno ha sido reportada como inhibitoria en la remoción de pireno (Mc Nally, Mihelic y Lueking 1999). Dean-Ross et al. (2002) observó una disminución en la remoción de pireno cuando fluoranteno estuvo presente; así como, una disminución en la remoción de antraceno en presencia de fluoranteno. Estas interacciones y resultados previos, podrían explicar el complejo proceso ocurrido en nuestros tratamientos. Los resultados sugieren que existió inhibición de la degradación de los HPA ya sea por la presencia de los diversos hidrocarburos al mismo tiempo como por la “incompatibilidad” de los cultivos mixtos. Algunos reportes indican que la presencia de un contaminante puede inhibir la degradación de un segundo compuesto (Xiaoqiang et al. 2007). Por otro lado, otros investigadores indican que cuando existe una variedad de contaminantes orgánicos en degradación puede existir un mejoramiento en la degradación por la presencia de fuentes adicionales de carbono (Ogunseitan y Olsen 1993). La degradación bacteriana de antraceno por

Rhodococcus sp. en la degradación de pireno por *M. flavescens* ha sido reportada también como inhibitoria en la presencia de fluoreno en el medio (Carmichael y Pfaender 1997). El efecto de compuestos tipo surfactantes producidos por los microorganismos (que presumiblemente produjeron los inóculos de acuerdo a los estudios de tensión superficial, Figura 22), cuando crecen en presencia de hidrocarburos aromáticos, los solubiliza e incrementa su concentración en el medio. Este fenómeno algunas veces causa inhibición en el proceso de degradación (Oleszczuk y Baran 2005).

Durante el periodo de incubación se presentaron pérdidas por efecto de evaporación y su incremento estuvo en función de la menor complejidad de los HPA en estudio, aunque estas fueron mínimas, comprendidas entre un 2 – 12% (Figura 36).

Los niveles de evaporación contrastan con los obtenidos en los sistemas con queroseno adicionado, ya que estos últimos presentaron niveles de remoción por evaporación de hasta cuatro veces más, presumiblemente debido a la evaporación simultánea con el queroseno. Debemos indicar que los sistemas no fueron cerrados por lo que no se podía evitar la volatilización de estos.

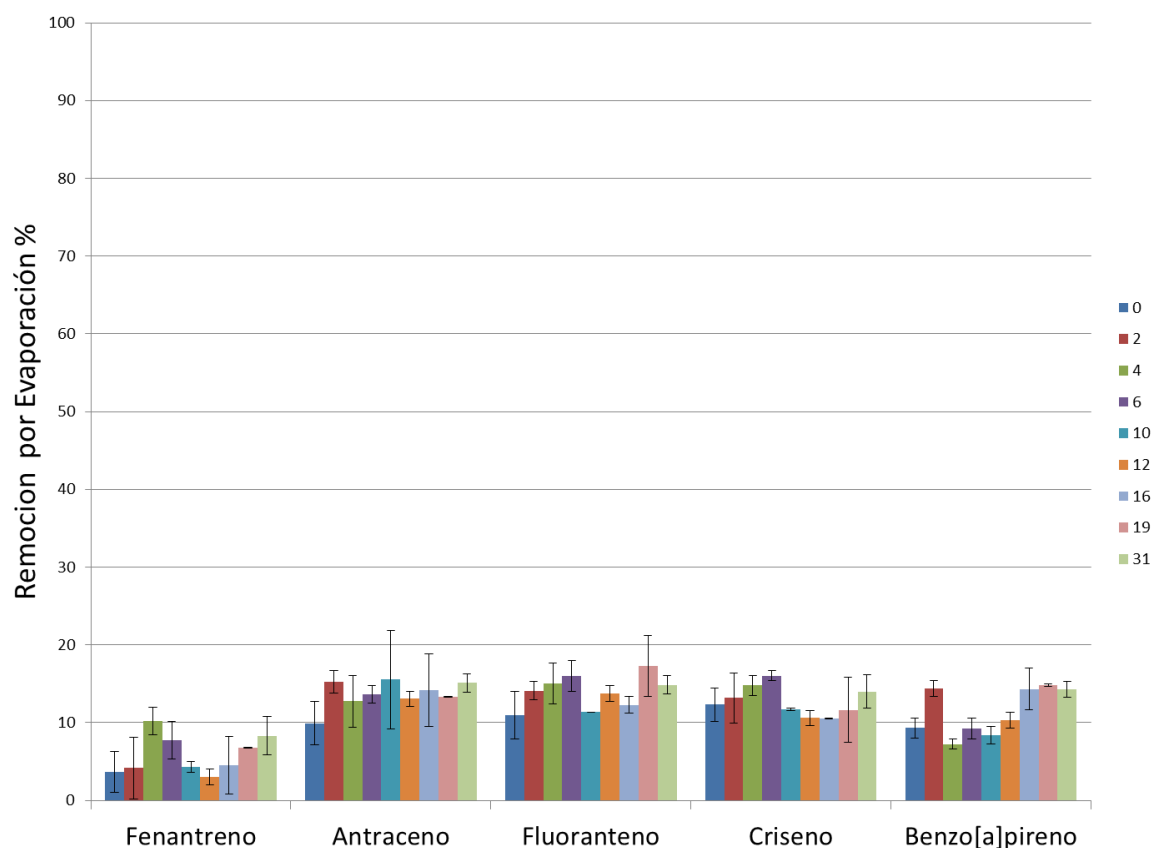


Figura 36. Evolución de la evaporación de los HPA durante el tratamiento

7.2.3 Evolución del CM en el proceso de remoción de HPA

7.2.3.1 Cinética de crecimiento del CM durante el proceso de remoción de HPA como única fuente de carbono

Podemos observar que la velocidad de remoción de los diferentes HPA estuvo en el rango comprendido entre 4 – 6 mgHPA/l•día en los primeros cinco días (**Figura 37**). Los HPA fenantreno y antraceno son estructuralmente semejantes (tres anillos aromáticos) por lo cual su cinética de remoción fue semejante. En el caso del hidrocarburo fluoranteno, también tiene tres anillos aromáticos pero además tiene un anillo tipo pentano no aromático lo cual podría dificultar el rompimiento/degradación de las estructuras. Los resultados contrastan con los obtenidos en los sistemas en los que se empleó queroseno para promover el co-metabolismo de los HPA en estudio. Los niveles de remoción en presencia de queroseno estuvieron dentro del rango 30 – 55%, lo que nos confirma nuevamente que la presencia de queroseno favorece la remoción de HPA. La tendencias de remoción fueron ajustadas a un modelo hiperbólico, en donde la remoción de HPA fue entre 1.5 y 4% por día fue observado durante los primeros cuatro días del tratamiento; después disminuyó a lo largo de los próximos 15 días hasta que alcanzó una velocidad de remoción entre 0.3 y 1.5% por día; finalmente fue despreciable después del día 20.

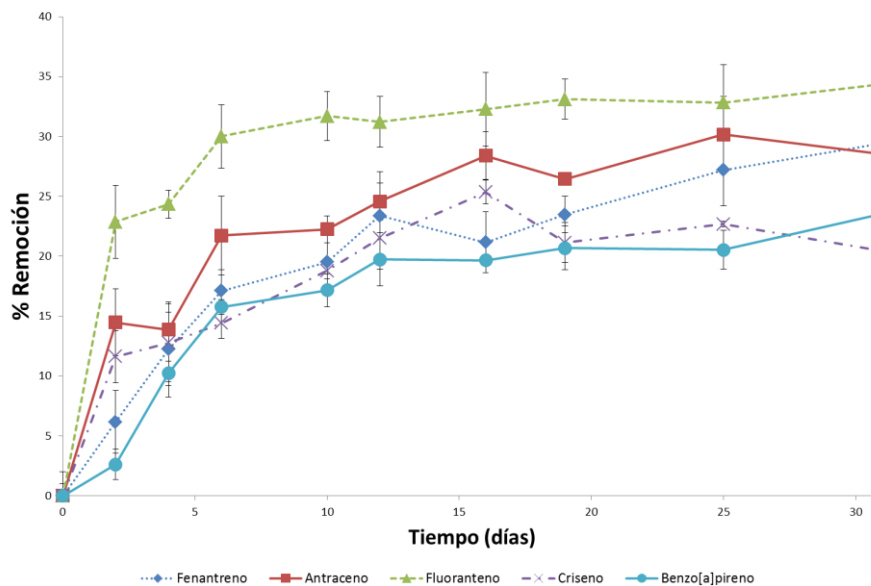


Figura 37. Remoción de HPA como única fuente de carbono por el cultivo mixto proveniente de EL+BC.

Se realizó cuenta viable en caja del sistema (EL + BC) con la finalidad de observar cambios en la población microbiana y poder correlacionar los géneros presentes a lo largo del proceso de remoción, con las cepas puras aisladas previamente. La disminución de la cuenta microbiana fue evidente (Figura 38) durante el proceso de remoción, en particular, durante la primera semana pero después de diez días el conteo total fue estable siendo posible realizar el aislamiento de algunas bacterias que pertenecían a cada material orgánico (EL o BC). Este fenómeno puede indicar el efecto nocivo de los HPA sobre los microorganismos. Después, sólo aquellos microorganismos con capacidad de tolerar y/o usar a los HPA como única fuente de carbono serán lo que prevalezcan en el sistema. Es en este punto, en donde algunos géneros identificados no fueron capaces de seguir creciendo en el sistema. De acuerdo a los resultados los microorganismos que prevalecieron fueron los del género *Bacillus sp.*, *Gordonia*., *Rhodococcus*. (Figura 38, 32/22"/44/26/25), *Naxibacter*. (Figura 38, 40/48) y *Stenotrophomonas*. (Figura 38, 2/25/26/39/50).

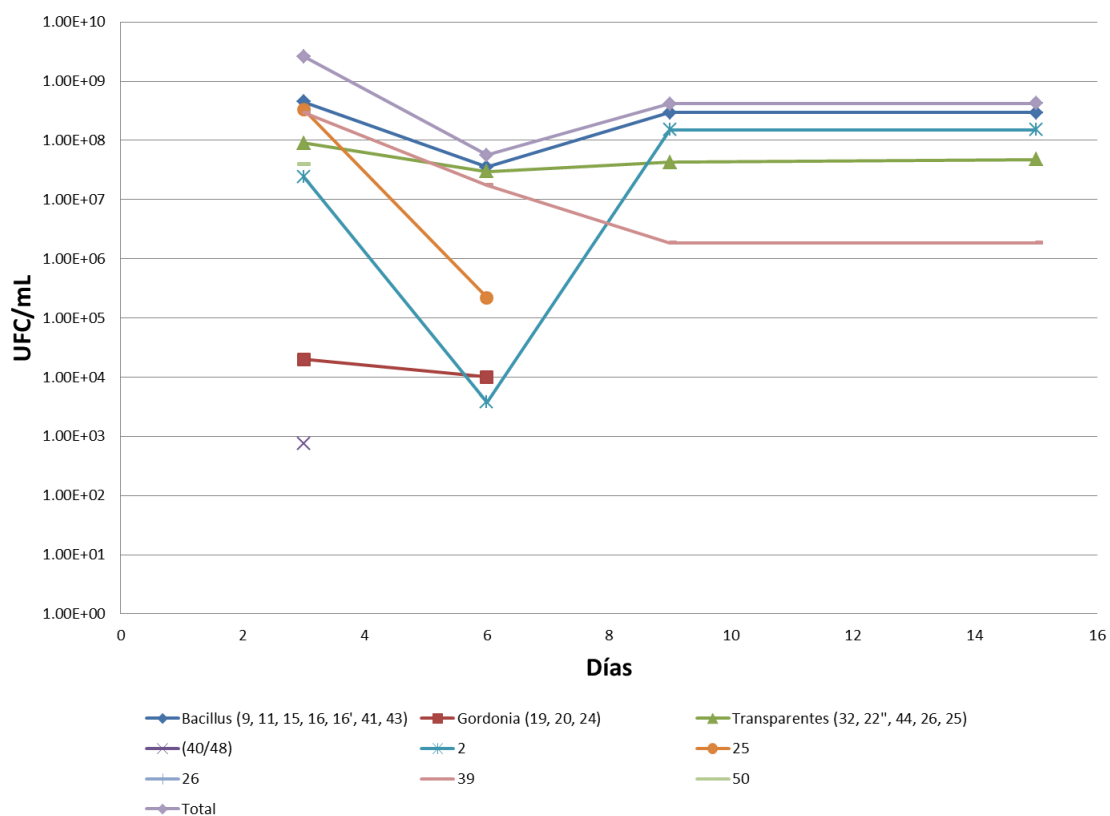


Figura 38. Evolución microbiana del sistema (EL + BC) durante la remoción de HPA

Como se muestra en la **Tabla 17**, estos microorganismos fueron claramente identificados debido a su morfología o color; sin embargo, el grupo o especie microbiana dominante en el cultivo mixto es desconocida.

Los resultados indican la presencia de por lo menos 16 microorganismos diferentes presentes a lo largo de quince días de la prueba, tiempo en el cual se observó el mayor nivel de remoción de HPA en el sistema (**Figura 39**). De los microorganismos identificados, seis de ellos pertenecen al EL y diez al BC (**Tabla 17**). Como podemos observar los géneros: *Bacillus*, *Rhodococcus* y *Naxibacter*, se encuentran en ambos materiales orgánicos que de acuerdo a su origen y las características de estos géneros (de los cuales se mencionará más adelante) justifican su resistencia a sobrevivir en el sistema. Aproximadamente 50% de los microorganismos identificados provenientes del BC son Gram negativos y fueron capaces de sobrevivir, característica de este tipo de microorganismos como lo indicó **Kaplan y Kitts (2004)**. Siete géneros fueron identificados por lo que al menos 58% del total (12 géneros) se encontraron en una proporción tal que se pudieron cuantificar por técnicas tradicionales de microbiología.

Tabla 17. Microorganismos en común entre los EL y el BC

EL				BC			
# Cepa	Genera	Phylum	%CM	# Cepa	Genera	Phylum	%CM
3/1	<i>Rhodococcus</i>			7/2	<i>Delftia</i>		
3	<i>Streptomyces</i>			5/1	<i>Stenotrophomonas</i>	P	60
2/2	<i>Gordonia</i>	A	60	1/1	<i>Naxibacter</i>		
2	Actinomycetales			1	<i>Rhizobium</i>		
1	<i>Dietzia</i>			3	<i>Mycobacterium</i>		
1	<i>Kocuria</i>			1/1	<i>Rhodococcus</i>		
5/5	<i>Bacillus</i>	F	25	1	<i>Gordonia</i>	A	32
2/2	Bacteria		10	1/1	<i>Brevibacterium</i>		
1/1	<i>Naxibacter</i>	P	5	1/1	Actinomycetales		
				1/1	Burkholderiales		
				2/2	<i>Bacillus</i>	F	8

A: Actinobacteria; P: Proteobacteria; F: Firmicutes; %CM: Porcentaje de contribución al cultivo mixto. Números en negritas significa: microorganismos detectados durante la remoción de HPA como única fuente de carbono.

Sin embargo; es necesario indicar que se hicieron frotis y la tinción de gram de las muestras a los días indicados y se observó la presencia de género *Streptomyces*. (identificado por su morfología filamentosa) pero no hubo crecimiento en placa de este. El crecimiento de los microorganismos en un medio rico en nutrientes como el agar nutritivo, permitió el crecimiento acelerado del género *Bacillus* y posteriormente (2 o 3 días) el crecimiento de otros géneros. Lo cual demuestra la posibilidad de una competencia intrínseca por el sustrato, de esta manera muchos microorganismos se ven afectados en su crecimiento por la presencia del otro, razón por la cual posiblemente no pudimos observar el crecimiento del género *Streptomyces*. aún cuando se encontraba en el sistema. Este fenómeno pudo ocurrir con otros géneros por lo cual es necesario implementar una metodología de preferencia basada en herramientas de biología molecular que sea lo suficientemente sensible como para detectar la presencia de diversos grupos microbianos en un mismo sistema.

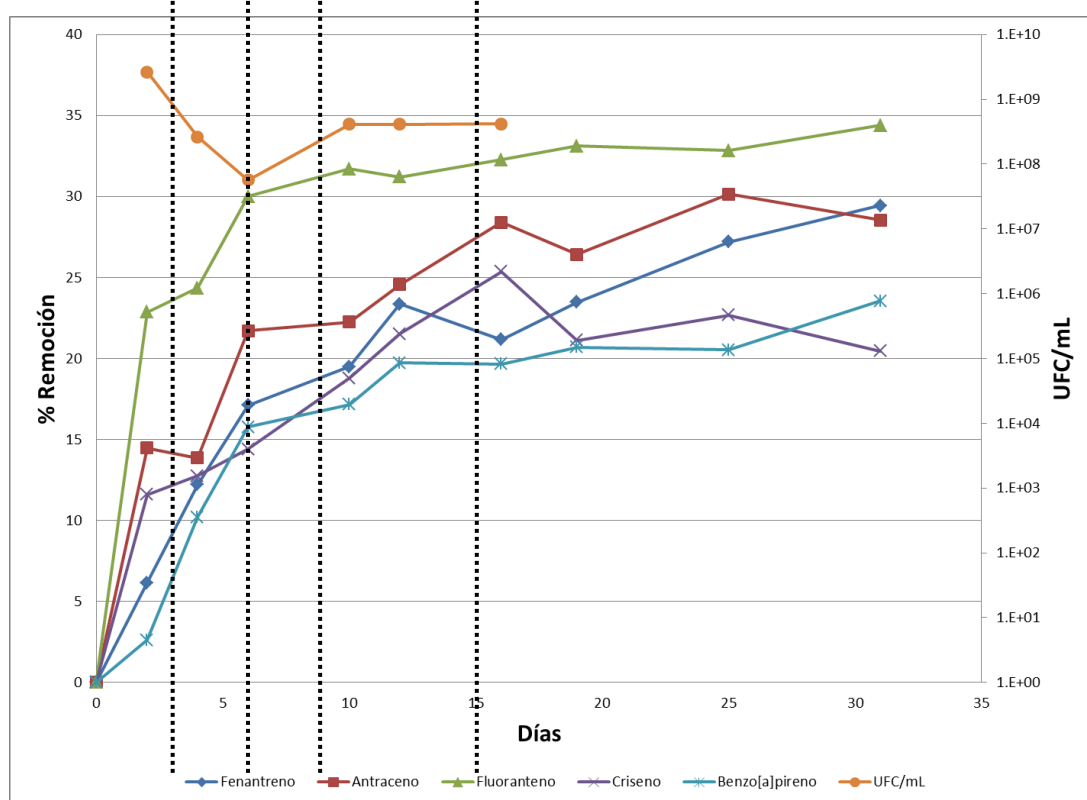


Figura 39. Cinéticas de remoción de HPA y crecimiento microbiano

7.2.3.2 Monitoreo de los integrantes del CM mediante DGGE

La amplificación del gen *rpoB* fue llevada con éxito como se observa en la **Figura 40**, para las bacterias del CM. Sin embargo, al realizar la técnica por DGGE no se logró obtener una sola banda característica para cada microorganismo (**Figura 41**).

Este resultado pudo ser consecuencia de una especificidad baja de los oligonucleótidos diseñados, la amplificación de una región muy extensa del gen lo que se tradujo en el gel con una baja diferenciación en las pares de bases o por último la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos la cual no fue suficientemente específica lo que pudo dar origen a la unión en sitios no específicos y su posterior amplificación. Pese a los problemas encontrados se dio seguimiento a la MHS a lo largo de una semana. Los resultados mostraron una variación en el grosor (intensidad) y número de bandas (**Figura 42**).

Pese a que existió co-migración de bandas en las muestras analizadas a los días 2, 4 y 9 (que de acuerdo a los resultados de la cinética de crecimiento, fue durante los primeros días en donde la remoción fue más intensa) se observó que existen cambios en la microbiota en general a lo largo del proceso de remoción de HPA. Dada la baja resolución obtenida no fue posible identificar cuántos y cuáles microorganismos involucrados en la remoción de HPA estuvieron presentes.

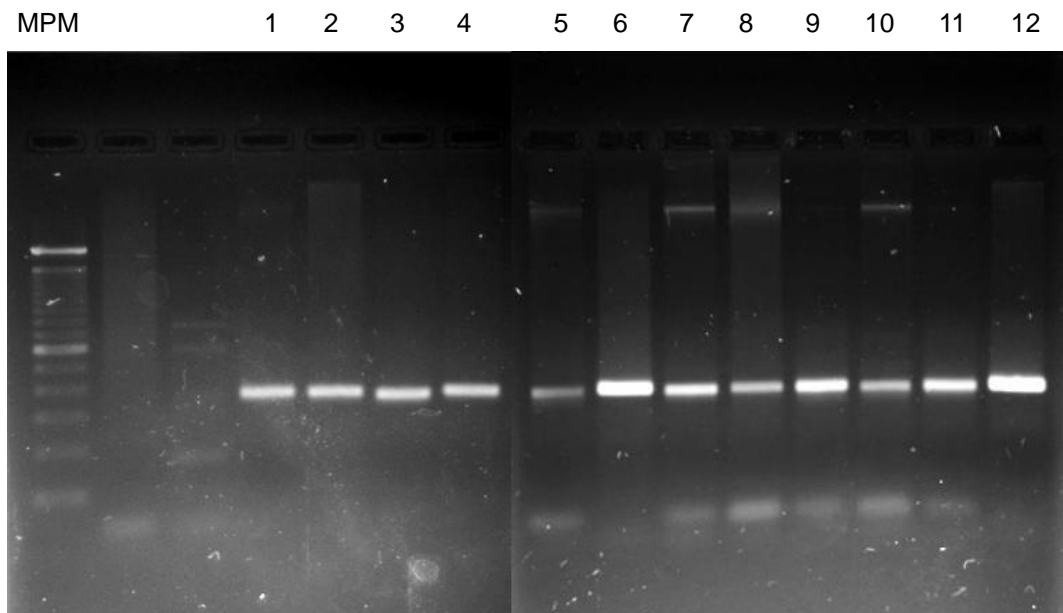


Figura 40. Amplificación del gen *rpoB* (tamaño esperado 350pb, marcador 100 pb)

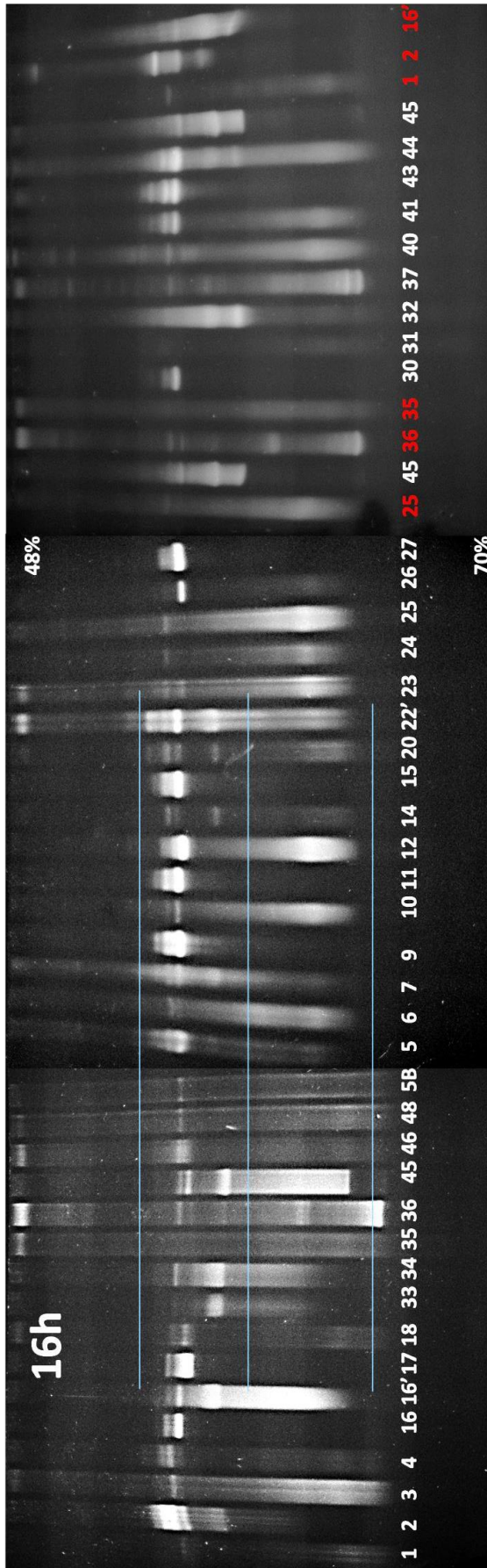


Figura 41. DGGE del gen rpoB para las bacterias en estudio

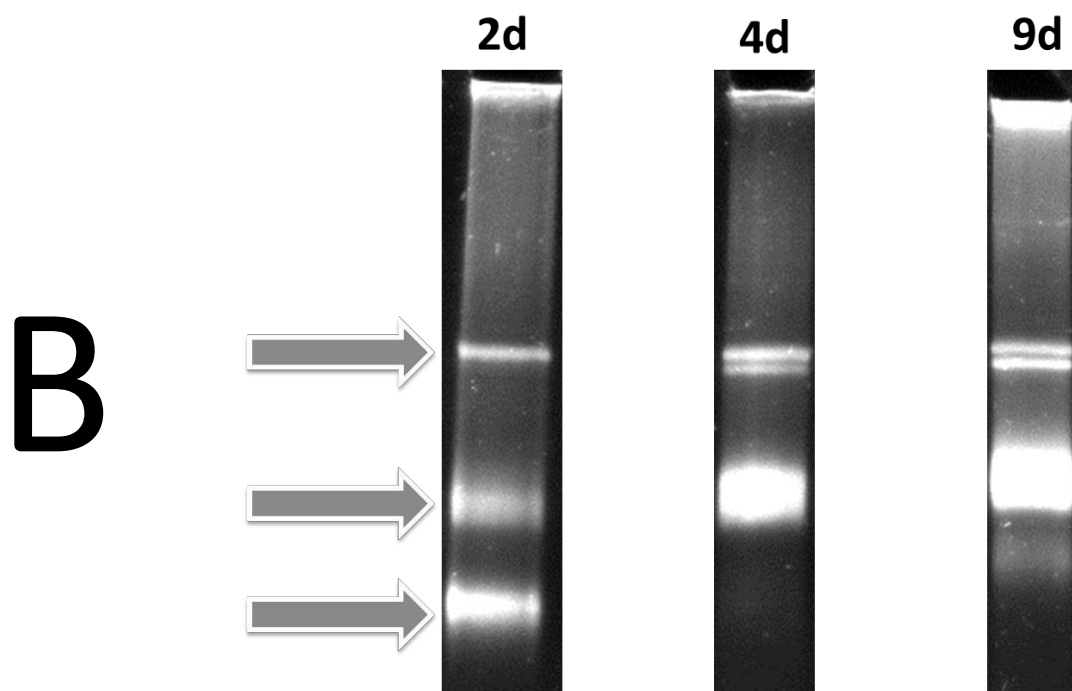
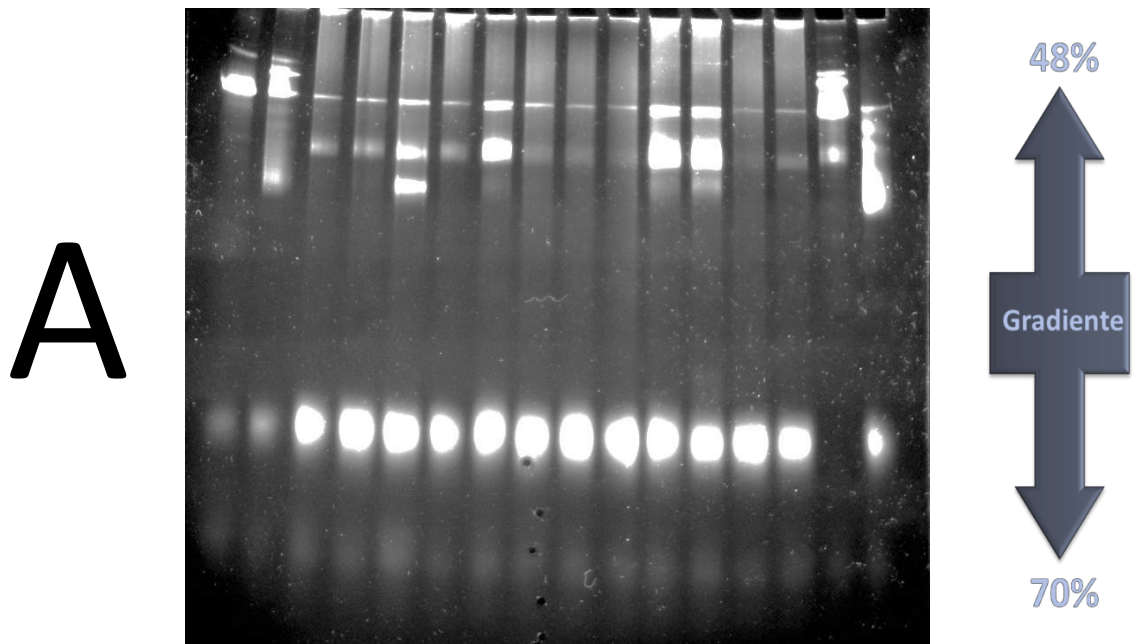


Figura 42. DGGE del gen *rpoB* para la MHS durante los tres puntos de muestreo (A), amplificación de la zona de interés (B)

7.3 Etapa 3

7.3.1 Discusión de la eficiencia de remoción del cultivo mixto seleccionado y un cultivo mixto comercial, en la remoción de HTP e HPA en presencia/ausencia de sustancias húmicas y nutrientes.

El presente estudio demostró que las SH aumentan la remoción de HTP pero es dependiente de los microorganismos implicados. Los fenómenos podrían ser consecuencia del aumento de la solubilidad en hidrocarburos en presencia de las SH por lo que la probabilidad de que los inóculos entren en contacto directo con las moléculas de hidrocarburo se incrementó, lo que lleva a un aumento en la tasa de transporte al interior de las células y por lo tanto la degradación.

Sin embargo, cuando el sistema de transporte bacteriano se saturó por las moléculas de hidrocarburo (20000 y 50000 mgHTP/kg), un mayor incremento en la solubilidad de HTP no condujo a una mejora en la degradación. Aunque los HTP pudieron haber comenzado a ser más solubles con la incorporación de SH; aun así, pudieron no ser degradado por los cultivos mixtos.

El análisis de la composición de combustóleo (considerado como HTP) mostró una alta concentración de las fracciones aromáticas y asfaltenos, ambos considerados por ser recalcitrantes. Los HTP estuvieron compuestos por las siguientes fracciones: hidrocarburos alifáticos, $35 \pm 2\%$ (p/p); HPA, $9 \pm 3\%$ (p/p); ácidos grasos saturados, $32 \pm 2\%$ (p/p) y asfaltenos, $24 \pm 3\%$ (p/p) (**Tabla 18**). Suponiendo que los asfaltenos son compuestos recalcitrantes, la máxima remoción de hidrocarburos esperada será de 75% (p/p).

7.3.1.1 Remoción de hidrocarburos

Uno de los principales objetivos de este trabajo fue obtener una población microbiana en un consorcio indefinido capaz de ser seleccionado naturalmente por la cooperación metabólica de sus miembros en la degradación de queroseno seguido por el aislamiento de sus miembros cultivables.

Ozaki et al. (2006) indicó que consorcios microbianos no definidos capaces de degradar petróleo crudo o fracciones destiladas sería adecuado para bioaumentación en sitios contaminados debido a los miembros estables y su amplia actividad degradante. Una estrategia exitosa para la biorremediación *in situ/ex situ* puede ser la combinación, en una única cepa bacteriana o en un consorcio microbiano, de

diferentes capacidades degradadoras con otras características genéticas que proporcionan ventajas selectivas en un ambiente dado (Díaz 2004; Megharaj et al. 2011).

Para evitar que los microorganismos tuvieran una exposición repentina a las tensiones del suelo (inanición o la susceptibilidad a la exposición a hidrocarburos, etc.) utilizamos queroseno como única fuente de carbono debido a que su contenido de hidrocarburos alifáticos y aromáticos podría ser utilizado como fuente de carbono por los microorganismos aislados de EL y BC. (Megharaj et al. 1997) indicaron que la pre-adaptación de las bacterias para el entorno destino, antes de la inoculación, mejora la supervivencia, persistencia y su actividad en la degradación, lo que lleva a una mayor biorremediación de los suelos contaminados.

Rios-Rodríguez (2011) y González Garduño (2011) observaron que las cinéticas de remoción de HTP por los tratamientos (durante 34 días de fermentación sólida) mostraron un comportamiento similar, como podemos ver en la Figura 43 (se muestran solo las tendencias de la remoción a modo de ilustración en el comportamiento de las cinéticas). El proceso de remoción comenzó a verse reducido después del día 17 en la mayoría de los casos, pero no se detuvo, mostrando que el proceso de remediación continuó.

La remoción de combustóleo estuvo fuertemente influenciada por la presencia de inóculos (CM o CMC). Aunque la presencia de inóculos tuvo un efecto positivo, la presencia del CM tuvo el más alto nivel de remoción de HTP. En la mayoría de los casos también la interacción con las SH favoreció la remoción de combustóleo.

La máxima remoción de HTP (restando el efecto del blanco (a), el cual varió entre 3.7, 1.2 y 0.5% (p/p), para los tratamientos de 5000; 20000 y 50000 mgHTP/kg, respectivamente) fue de hasta 54, 45 y 32% (p/p) cuando se añadió el CM y de 51, 34 y 18% (p/p) cuando se añadió el CMC, para los tratamientos de 5000; 20000 y 50000 mgHTP/kg respectivamente, después de 34 días. El comportamiento cinético muestra un comportamiento típico en el que una tasa máxima de remoción fue en los primeros 15 días mientras que disminuye en función del tiempo (Figura 43). La cinética de remoción de HTP mostró el resultado de una degradación rápida, seguida de una segunda fase, mucho más lenta que se observa comúnmente en los suelos y sedimentos durante la biorremediación (Semple et al. 2004).

El efecto estimulante de las SH sobre la degradación de hidrocarburos aparece en un período más prolongado (**Figura 43**). Estos resultados concuerdan con los de **Nanny et al. (2001)**, quienes encontraron que las sustancias húmicas podían retener masa de hidrocarburo ligero, los cuales podrían permanecer adsorbidos por un largo tiempo (disminuyendo su disponibilidad y por lo tanto su toxicidad) y eventualmente n-alcenos de cadena larga podrían ser liberados y convertirse en disponibles para la degradación microbiana, tal como le CM.

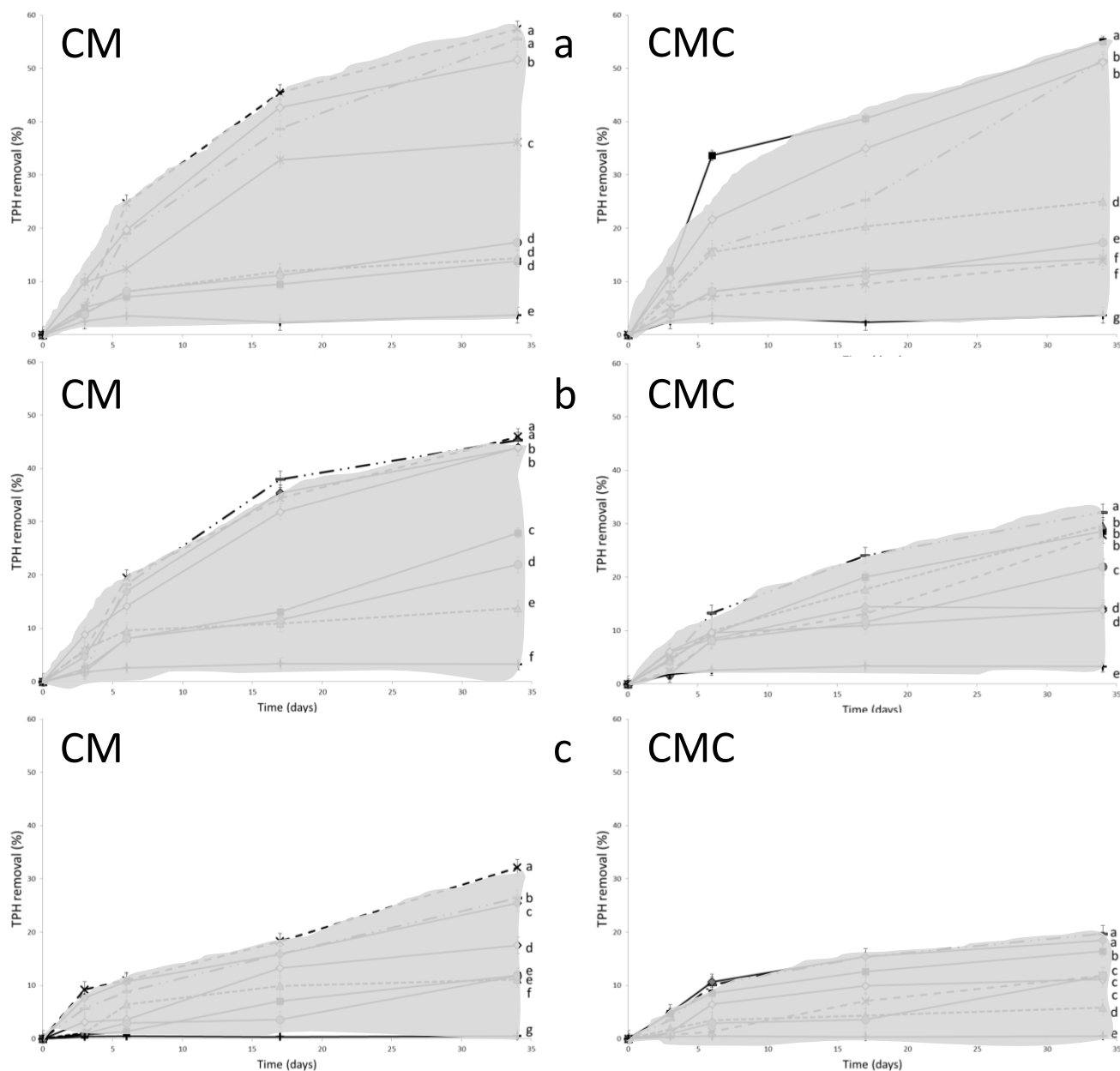


Figura 43. Cinéticas de remoción de HTP mediante la adición de SH e inóculos a diferentes concentraciones de hidrocarburos, a) 5000 mgHTP/kg; b) 20000 mgHTP/kg y c) 50000 mgHTP/kg. CM: cultivo mixto; CMC: cultivo mixto comercial. Mismas letras significan, que no hubo diferencia estadística significativa (Duncan y Fisher LSD)

Por lo tanto, la baja remoción de HTP por el CMC + SH pueden ser debido a la absorción temporal de hidrocarburos a la matriz húmica de los derivados de leonardita los cuales pueden limitar el acceso de los hidrocarburos a los microorganismos en el suelo o por el comportamiento opuesto en el que hay un exceso de desorción de contaminantes que aumentan la toxicidad en los sistemas (**Figura 44 y 45**).

El blanco (a) tuvo un pequeño porcentaje de remoción de HTP, mientras que el blanco (b) tuvo casi la misma tasa de remoción. Los niveles de remoción en sistemas que sólo se estimularon con sales minerales o agua mostraron cierta tasa de remoción que podría explicarse debido a la interacción de las sustancias húmicas presentes en el suelo que de acuerdo con su caracterización el contenido de ácido húmico y fúlvico fue de $0.23 \pm 0.05\%$ (p/p) y $1.42 \pm 0.03\%$ (p/p), respectivamente.

Conte et al. (2001) y **Petruzzelli et al. (2002)** investigaron la influencia de toda la materia orgánica; es decir, AH y AF en la translocación de HPA a través de un suelo antes y después de la oxidación con peróxido de hidrógeno para eliminar la materia orgánica, el cual fue posteriormente tratado con cantidades crecientes de sustancias húmicas exógenas; es decir, incorporadas intencionalmente. La liberación de HPA del suelo aumentó con la adición de AH exógenos mientras que los AF aumenta su movilidad y se favoreció su lixiviación, tanto para el suelo oxidado como no oxidado. Recuperaciones de HPA fueron inferiores en el suelo no oxidado (debido al peso de las fracciones de materia orgánica de alto peso molecular), lo que revela la importancia de la materia orgánica nativa en el aumento de la retención de HPA en los suelos. Este estudio muestra que la movilidad de los HPA en los suelos puede ser controlada por el contenido de sustancias húmicas, pero es posible suponer por el hecho de la hidrofobicidad que los HTP se verá afectados de la misma manera.

En todos los tratamientos con el CM y los AF favorecieron la remoción HTP (**Figura 44**). A pesar de que la presencia de microorganismos hidrocarbonoclastas tiene un efecto positivo, la interacción con las SH favorece mucho más la remoción de combustóleo (**Figura 44**).

Liem et al. (2003) hizo un estudio sobre la remoción HTP sobre suelo arcilloso contaminado con diesel a 10000 mg/kg e incorporando ácidos húmicos en dosis de 0 a 5% en peso para evaluar su impacto en la remoción de hidrocarburos. Los experimentos se llevaron a cabo durante un período de 90 días. Después de este período de tiempo, se observó una remoción de hidrocarburos entre 87 y 93%. Estos resultados son similares a los obtenidos en este trabajo a un bajo contenido de combustóleo (5000 mgHTP/kg).

7.3.1.2 Efecto del inóculo

La fracción teórica degradable (75%, p/p) fue casi eliminada en los sistemas con 5000 mgHTP/kg en 34 días de acuerdo con [Rios-Rodríguez \(2011\)](#) y [González Garduño \(2011\)](#) lo cual se muestra en la [Figura 44](#). [Vogel \(1996\)](#) informó que el nivel de descontaminación de un suelo contaminado principalmente dependerá de la composición de hidrocarburos y la microbiota disponible. En cuanto a la estructura de hidrocarburo, [Atlas y Cerniglia \(1995\)](#) han informado que los compuestos orgánicos de bajo peso molecular y estructura molecular sencilla se eliminan preferentemente por muchos microorganismos, pero, los hidrocarburos con estructuras más complejas han mostrado una alta resistencia a la descomposición microbiana ([Bossert y Bartha 1986](#)).

Es bien sabido que se requieren conjuntos de poblaciones mixtas con capacidades enzimáticas generales amplias para aumentar la velocidad y el grado de biodegradación de HTP. Se sugirió que los porcentajes de remoción de HTP podrían incrementarse mediante el uso del CM que se aisló en este trabajo, teniendo en cuenta su gran capacidad para eliminar HTP a partir de mezclas complejas de hidrocarburos. De acuerdo con [Rios-Rodríguez \(2011\)](#) y [González Garduño \(2011\)](#) la presencia de AF en todos los sistemas con CM o CMC favoreció la remoción HTP, solos o en combinación con AH. A pesar de que la remoción de hidrocarburos entre los inóculos fue similar cuando ambos estuvieron acondicionados con las SH. Por otro lado, hubo una disminución de remoción de HTP cuando los tratamientos se acondicionaron con ambas SH. El CM tuvo casi 0.6 veces más remoción de HTP que el CMC. El CM mostró una alta eficiencia de remoción de HTP, pese a que los microorganismos aislados de los materiales orgánicos nunca estuvieron en contacto previo con el contaminante. Una pequeña mejora del efecto en la remoción es apreciable cuando se incorporó AF a los tratamientos con 5000 mgHTP/kg pero se observó un efecto negativo cuando aumenta el contenido del combustóleo (20000 mgHTP/kg).

La presencia de CM en el proceso de remoción de combustóleo es evidente, así como la presencia de sustancias húmicas. Una concentración baja de combustóleo (5000 mgHTP/kg) no afectó la remoción de HTP en presencia de SH ([Figura 44 y 45](#)). La remoción HTP, en presencia del CM aumentó alrededor de 20% (p/p) y en presencia del CMC fue alrededor de 70% (p/p), cuando se añadieron SH, lo que muestra que el CMC obtiene un mayor beneficio tal vez como consecuencia de la alta

estimulación de esta microbiota mientras CM no mostró gran mejora tal vez debido a su origen (aislado de las SH). Cuando la concentración de combustóleo aumentó a 20000 mgHTP/kg hubo un efecto negativo sobre la remoción de HTP.

Tabla 18. Caracterización fisicoquímica y biológica de los materiales utilizados para validar la remoción de HTP e HPA por el CM

	Análisis	AH	AF	S	HC
FÍSICAS	Capacidad de retención de agua (%)	N/A	N/A	43	
	Humedad (%)	6.56	2.38	1.53	
	Materia Orgánica (%)	21.55**	80.57	3.89	
	Carbono Orgánico (%)	12.5**	46.8	2.3	
	Nitrógeno Total (%)	0.33	0.93	0.13	
	Fósforo Asimilable (mg/kg)	N/A	N/A	16.17	
	pH	11.88	7.79	7.95	
QUÍMICAS	HTP's				***
	Asfaltenos (Asf) (%)				24
	H. libres de asfaltenos (%)				76
	H. Alifáticos (HAl) (%)				35
	H. Aromáticos (HAr) (%)				9
	H. Policíclicos Aromáticos (HPA) (%)				32
BIOLÓGICAS	Bacterias heterótrofas (UFC/g material)	1.72 x 10 ¹⁰	5.6 x 10 ⁸	2.3 X10 ²	
	Bacterias hidrocarbonoclastas (UFC/g material)	1,32 x 10 ⁷	1.37 x 10 ⁹	1.1 X 10 ¹	

AH: ácidos Húmicos, AF: ácidos fúlvicos, S: suelo, HC: hidrocarburo

La remoción HTP, en presencia de CM disminuyó alrededor de 26% (p/p) y en presencia de CMC alrededor de 70% (p/p). No obstante, aun cuando las SH estuvieron presentes, la remoción de HTP por el CM fue mayor que CMC. Una mejor adaptación del CM en el proceso de degradación de hidrocarburos en presencia de SH se debió quizá como consecuencia de que los microorganismos aislados están acostumbrados a vivir en estos materiales. Por el contrario, el contenido bacteriano del CMC probablemente no fue capaz de sobrevivir el tiempo suficiente para mantener su actividad de degradación debido a su baja capacidad de sobrevivir en concentraciones altas de combustóleo. También su baja eficiencia pudo ser debido a la falta de material enzimático producido por los integrantes del producto comercial para iniciar el metabolismo de los HTP.

Si eliminamos la remoción de los HTP llevada a cabo por las SH de cada tratamiento, con el fin de ver que efecto tuvieron sólo los inóculos, obtenemos los datos mostrados en la **Figura 45**. No obstante, el análisis de los datos mostró que la remoción de HTP por el CMC independientemente de la concentración del combustóleo mantuvo una tasa de remoción casi constante (**Figura 45**). Los inóculos añadidos por si solos en estos tratamientos sólo difirieron por 0.2 veces en la remoción de HTP (CM > CMC), sin embargo, el CMC se vio gravemente afectado, mientras que en el sistema con 50000 mgHTP/kg hubo pequeños efectos negativos (**Figura 45**); aunque la diferencia en la remoción HTP entre inóculos sólo fue 2.4 veces (CM > CMC).

En la literatura, se ha indicado que el fracaso de los tratamientos por bioaumentación ha sido por lo general atribuido a la baja capacidad de adaptación de los microorganismos ajenos a poblaciones microbianas naturales (**Vidali 2001**). Finalmente la mayor concentración de combustóleo afectó en mayor medida el CMC que al CM en la remoción HTP. Por un lado, la ventaja de las sustancias húmicas es que se incorpora fácilmente a grandes extensiones de suelos contaminados. Por otro lado, el CM aislado a partir de estructuras complejas (sustancias húmicas), puede trabajar sinérgicamente y aún mejor mostrar que las SH poseen microorganismos hidrocarbonoclastas que pueden ayudar en los procesos de biorremediación.

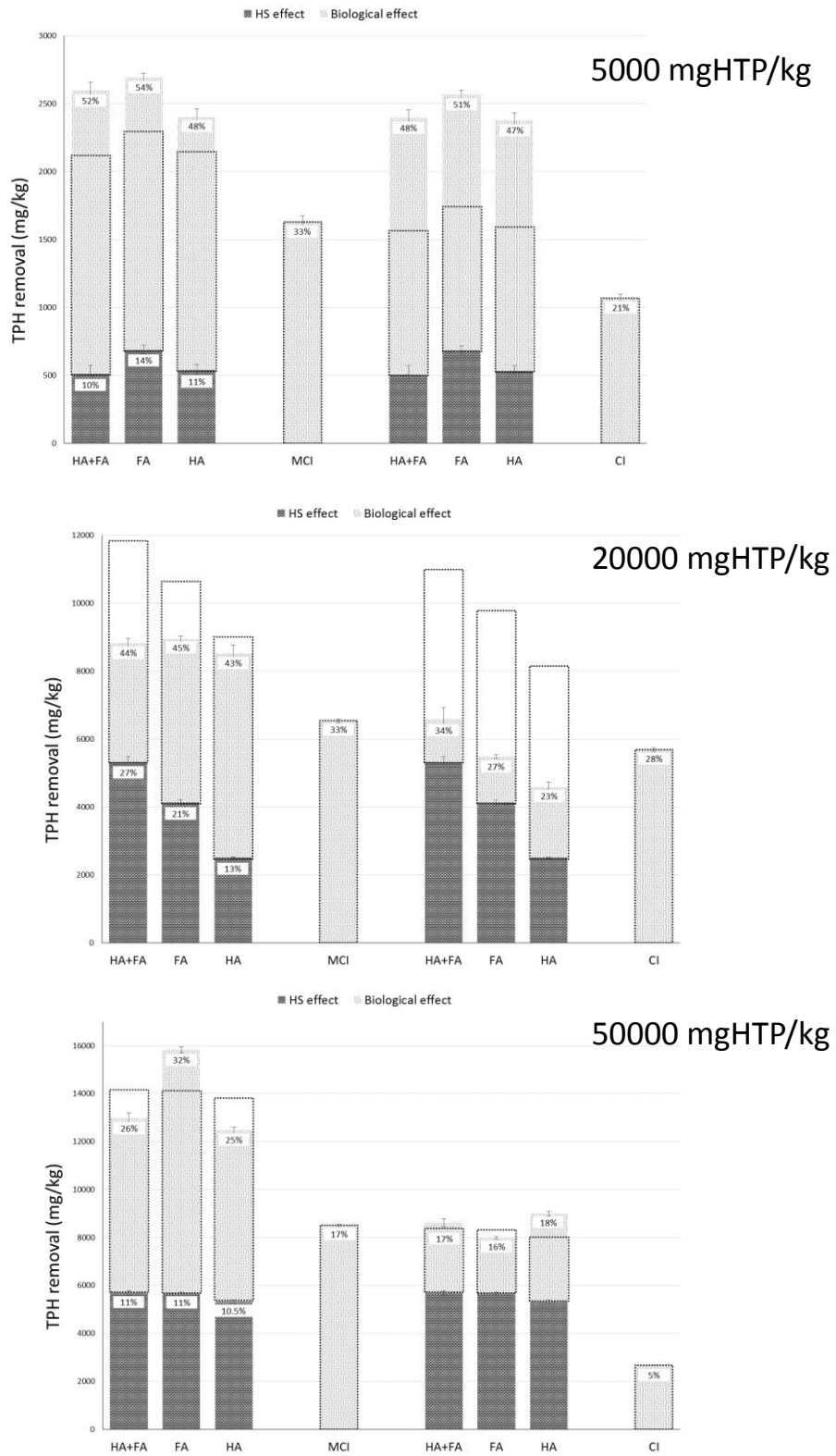


Figura 44. Comparación de la remoción de HTP (después de 34 días) entre inóculos y el efecto de absorción por las SH. La remoción de HTP se representan al restar el efecto del blanco. HA: ácidos húmicos; FA: ácidos fúlvicos, CM: cultivo mixto, CMC: cultivo mixto comercial.

7.3.1.3 Efecto de las SH

El efecto de sorción por las SH jugó un fuerte papel en el proceso de remediación como se muestra en la **Figura 44**. El efecto de sorción fue responsable en algunos casos de más de la mitad de la remediación total. Los datos demostraron que la pequeña cantidad de SH mejora la remoción de HTP independientemente de la presencia de un inóculo. No obstante del aumento de la cantidad del combustible la sorción fue casi constante, con la excepción de 20000 mgHTP/kg en la que el comportamiento fue diferente (**Figura 44**). La presencia de ambas SH no aumentó la tasa de remoción de HTP mientras que la presencia de solo los AF si lo hizo, con alguna excepción (sistema con 20000 mgHTP/kg). Hubo un efecto negativo cuando ambas sustancias húmicas están en el sistema (**Figura 44 y 45**). Este hecho podría ser explicado por la descomposición de los complejos penetrados de sustancias húmicas-hidrocarburos en el interior de la célula y aumento de la toxicidad como Kulikova, **Stepanova y Koroleva (2005)** mostraron. El efecto negativo en el proceso de remoción también podría ser debido a un exceso de desorción de combustible que tiende a incrementar la toxicidad porque tal vez la solubilidad y la exposición a los hidrocarburos es mayor cuando ambos agentes tensoactivos naturales están presentes, sobre todo en la presencia de AF. Aunque este efecto no es perceptible cuando sólo se usa una sustancia húmica (AH o AF) a la vez. Este efecto negativo cuando ambas sustancias húmicas están en el sistema, no necesariamente indican que la adición de diversos agentes tensoactivos favorece la remoción de hidrocarburos. **Bogan y Sullivan (2003)** analizaron seis suelos, obtenidos de pastizales y zonas boscosas en el noreste de Illinois con el fin de conocer el contenido del SH.

Resultados para HPA indican que el aumento del tiempo de contacto lleva a un aumento en el secuestro y la reducción de la biodegradación, y que el contenido de las SH fue el parámetro más importante que rige este proceso. Otros experimentos demostraron que la adición exógena de ácido fúlvico a un suelo con muy bajo contenido endógeno de AH/AF incrementó la biodegradación de pireno por *Mycobacterium austroafricanum*. Por supuesto, es preferible utilizar una menor complejidad y un sistema más económico dado que los AH aunque son más baratos que los AF, no es económicamente viable incrementar el costo del proceso si no hay diferencia significativa como muestra el análisis de medias entre tratamientos (**Figura 44 y 45**). Los ácidos fúlvicos sirven como un catalizador para los

microbios y como un agente tensoactivo muy potente. Estos pueden aumentar la toxicidad de los xenobióticos tóxicos para los microorganismos, por lo que se debe utilizar cuando la degradación primaria utilizando ácidos húmicos está casi completa.

Además, los ácidos fúlvicos aumentan la permeabilidad de la membrana, lo que facilita la exudación de enzimas extracelulares y más rápida absorción de moléculas de hidrocarburos para la oxidación (Karr 2013). Por otro lado, Lovley et al. (1996) mostró que los ácidos húmicos se pueden utilizar como aceptor final de electrones durante los procesos aeróbicos o anaeróbicos en suelos contaminados con HPA, y estos pueden contribuir a la oxidación o la reducción de hidrocarburos, promoviendo así la remoción más eficiente debido a los microorganismos hidrocarbonoclastas de las sustancias húmicas (como se demuestra en este trabajo) o por los inóculos añadidos. Estudios anteriores sobre el efecto de la adición de AH en suelos contaminados con hidrocarburos mostraron que mejoran la actividad microbiana. Si eliminamos la remoción de los HTP llevada a cabo por las SH de cada tratamiento, con el fin de ver que efecto tuvieron sólo los inóculos, obtenemos los datos mostrados en la Figura 45. En estos gráficos se puede observar con mayor claridad que las SH puede afectar el rendimiento general. El efecto de sorción fue responsable en algunos casos de más de la mitad del total de la remediación (Figura 44 y 45). Morris y Mosley (1998) examinaron ácidos húmicos para determinar su idoneidad como remediador de suelos contaminados con petróleo. En este trabajo, se demostró que pequeñas cantidades de ácido húmico (1%) mejora la actividad microbiana así como su alta sorción que representa aproximadamente la mitad de remediación total. Nanny et al. (2001), en un informe de investigación EPA eligió un humato (sal de sustancias húmicas) australiano para mejorar la remediación de suelos contaminados con petróleo, ya sea por procesos de sorción, biodegradación, o ambos. Ellos encontraron que la inoculación de un suelo virgen, con un cultivo microbiano degradador del petróleo en presencia de humatos, no sólo facilita la biodegradación, sino también ayuda a la remoción por sorción de n-alcanos superiores de 24 a 32 átomos de carbono. En la ausencia de humatos, los microbios degradan estos hidrocarburos de mayor cadena a un ritmo mucho más lento. La adición de SH en una concentración de combustóleo bajo (5000 mgHTP/kg) aumentó la remoción (entre 75 y 25%, p/p) independientemente del inóculo, mientras que el aumento de la concentración de combustóleo a un nivel medio (20000 mgHTP/kg) afectó la remoción más que la mayor concentración probada de combustóleo (50000 mgHTP/kg).

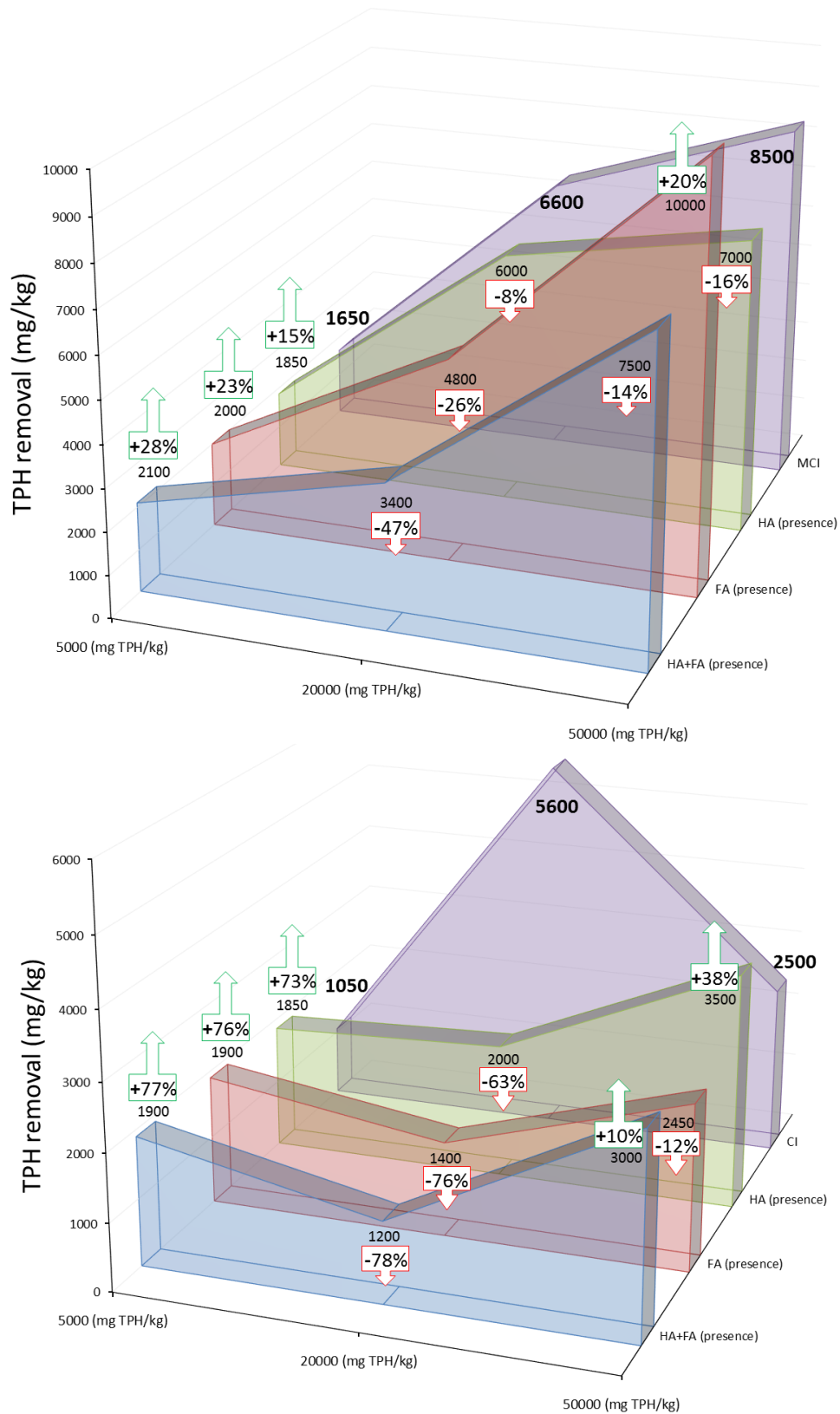


Figura 45. Efecto de las SH sobre la remoción de HTP por los inóculos (CM y CMC). La remoción de HTP se representan al restar el efecto de sorción de las SH. AH: ácidos húmicos; AF: ácidos fúlvicos, CM: cultivo mixto, CMC: cultivo mixto comercial.

7.3.1.4 Efecto de la contaminación por combustóleo

El efecto de las interacciones por las variables en estudio en los dos inóculos probados por **Rios-Rodríguez** y **González Garduño**, llevado a cabo por el análisis estadístico, se muestra en las **Figura 46**. Las interacciones principales se representaron gráficamente. El análisis de varianza (ANOVA), en el sistema con 5000 mgHTP/kg, indicó que todas las variables individuales que intervinieron en el modelo fueron significativas (es decir; AH, AF y el inóculo), sin embargo, la interacción entre los AF y los AH también fue significativa con un nivel de significación del 95% ($p < 0.05$). Como se muestra en la **Figura 46**, la presencia de la CM/CMC es crucial en el proceso de remoción como se esperaba. Aunque las SH tienen microorganismos hidrocarbonoclastas, no mostraron un efecto estadístico significativo por lo que su efecto en la remoción es aparentemente basado únicamente en sus propiedades físico-químicas.

Cuando el ANOVA se hizo para el sistema con 20000 mgHTP/kg, de nuevo todas las variables individuales que intervienen en el modelo fueron significativas, pero CM/CMC y las interacciones con los AF también fueron significativas. Por último, el sistema con 50000 mgHTP/kg mostró que todas las variables individuales que intervienen en el modelo fueron significativas, pero las interacciones de los AH y los AF, así como entre los AH y CM/CMC también fueron significativas. En este sistema, así como en el anterior, las interacciones entre los AF + AH fueron significativa pero con una tendencia a causar un efecto negativo en el proceso de remoción. Si el ANOVA se aplica en términos del efecto de la concentración de combustóleo, los resultados mostraron un efecto estadísticamente negativo en su remoción cuando la concentración aumenta; este efecto es más notable en ausencia de los inóculos como era de esperarse.

El nivel de remoción de los sistemas con 5000 mgHTP/kg podría ser más eficaz debido a la baja concentración de los hidrocarburos y la eficiencia de los inóculos. En el caso del sistema con 20000 mgHTP/kg hubo más hidrocarburos alifáticos que el sistema anterior, por lo que los microorganismos tienen más fuente de carbono para asimilar hasta que la proporción alifático/asfalteno es tal que comienza a disminuir el proceso de remoción debido a la ausencia de hidrocarburos de fácil asimilación. Este mecanismo no parece ocurrir en el sistema con 50000 mgHTP/kg tal vez como consecuencia del límite de los microorganismos para asimilar hidrocarburos sin perder viabilidad

(Figura 46). De acuerdo con los resultados es posible indicar que el aumento de la contaminación del suelo va a afectar el rendimiento global del CM, pero todavía tienen el potencial para mostrar la eficacia de sus miembros, así como el útil uso de las SH.

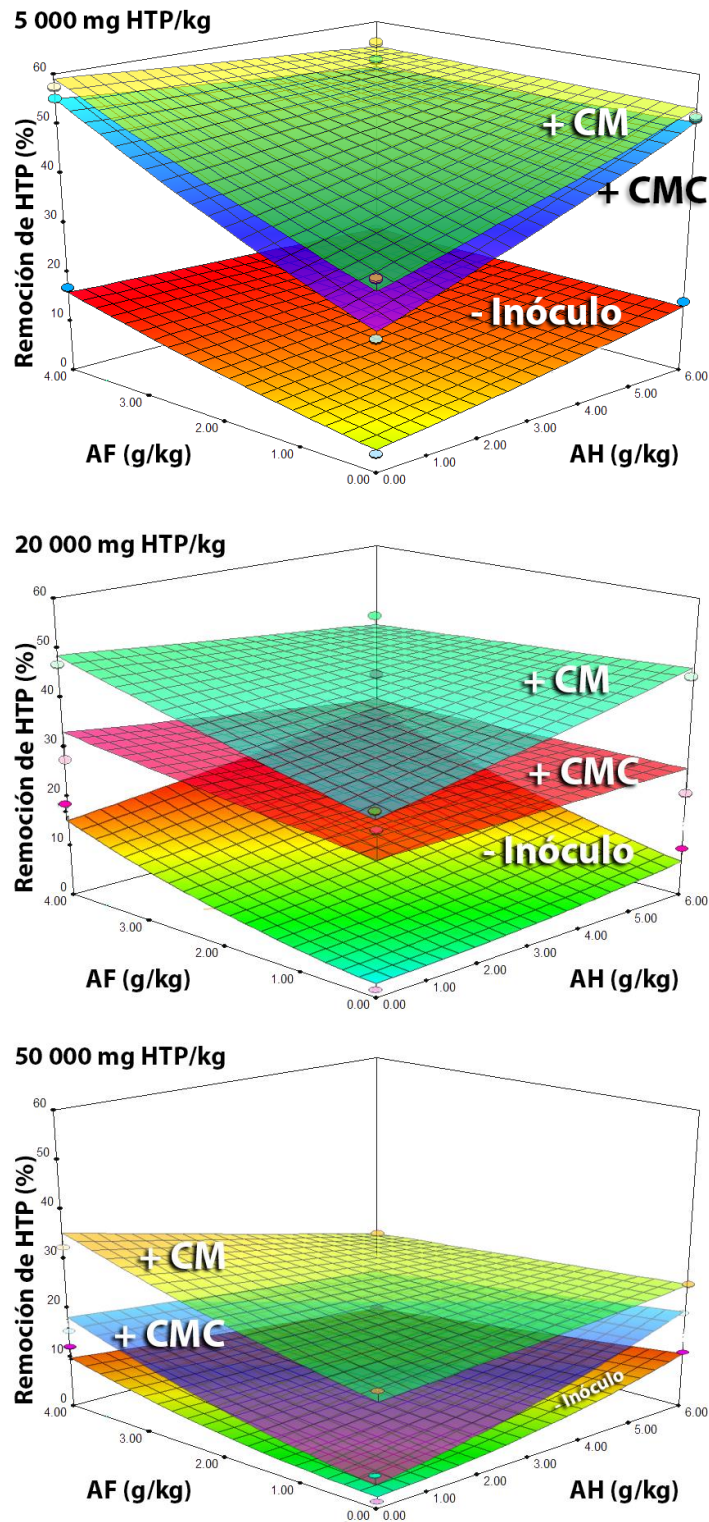


Figura 46. Resultados estadísticos que muestran las interacciones entre las SH y los inóculos. AH: ácidos húmicos; AF: ácidos fúlvicos, CM: cultivo mixto, CMC: cultivo mixto comercial.

7.3.1.5 Remoción de HPA

El análisis de la composición de hidrocarburos realizado por [Rios-Rodríguez](#) de los sistemas con AF + CM y CM en el sistema con 5000 mgHTP/kg ([Tabla 19](#)), ya que estos mostraron la mejor remoción de HTP sobre todos los tratamientos. Podemos observar que la composición de combustóleo tiene hidrocarburos alifáticos entre C14 y C32, con concentraciones entre 20 y 500 mg/kg; así como, la presencia de HPA entre 2 y 5 anillos con concentraciones que van de 20 a 300 mg/kg. La remoción de los hidrocarburos alifáticos de cadena larga y de HPA ([Tabla 19](#)) en el sistema con CM + AF, mostró la buena interacción entre todos los componentes estudiados.

El combustóleo consiste principalmente de alcanos lineales y ramificados con diferentes longitudes de cadena y contiene una variedad de compuestos aromáticos ([Tabla 19](#)). Muchos de estos compuestos, especialmente alcanos lineales, se sabe que son fácilmente biodegradables. En general, la disponibilidad de compuestos hidrófobos se determina por sus características de sorción, la disolución o las tasas de partición y por el proceso de transporte a la célula microbiana ([Sticher et al. 1997](#)). La biodegradación de combustóleo no parece estar limitado por las capacidades metabólicas del consorcio bacteriano, ya que una fracción significativa de hidrocarburos de alto peso molecular (> C30) fueron removidas a la misma velocidad. [Rapp y Gabriel-Jürgens \(2003\)](#) han informado de la degradación de hidrocarburos alifáticos hasta C16, que está de acuerdo con los resultados presentados aquí.

Los resultados indican la ausencia de crisenos en el final del proceso, pero hay que señalar que su concentración es muy baja. Sin embargo, la incapacidad bacteriana para el uso total de hidrocarburos parece ser debido a una limitación de transferencia de masa, en el que los hidrocarburos no están disponibles para los microorganismos. La composición de los hidrocarburos residuales sugiere que la continuidad de los procesos de remoción podría ser posible, pero que tomaría más tiempo y que sólo tendría lugar si los nutrientes necesarios están disponibles. [Ke et al. \(2010\)](#) sugiere que el éxito de la remoción/degradación de HPA (fenantreno, pireno y benzo[a]pireno) por un aislado bacteriano degradador de pireno no se basó únicamente en las cantidades de HPA solubles que pueden ser mejoradas con la incorporación de AH; la presencia de un degradador adecuado es también importante. Este trabajo mostró que la bioestimulación y bioaumentación pueden ser utilizados para mejorar la degradación de los HTP e HPA en el suelo.

La adición de inóculos que mejore la degradación de HTP puede ser de mucha mayor utilidad en condiciones menos favorables, tales como aquellos en los vertederos o en sitios con menos microorganismos degradadores nativos, o en remediación de ambientes contaminados con HTP o HAP. Los resultados mostraron que la eficacia en la degradación tanto HTP como de HPA siguió el orden: bioaumentación (CM) + bioestimulación + SH > bioaumentación (CMC) + bioestimulación + SH > bioestimulación + SH > bioestimulación > controles. Estos resultados sugieren que la inoculación de las cepas eficientes y algunos nutrientes pueden ser enormemente eficaces en la biorremediación de suelos contaminados. Además de las propiedades químicas y en vista de un posible uso de las SH como agente tensoactivo a nivel industrial, también es muy importante tener en cuenta los rendimientos de las SH de diferentes fuentes potenciales. Por ejemplo, el aislamiento de AH a partir de materia orgánica del suelo y agua es muy laborioso; además de los muy bajos rendimientos de estas fuentes naturales podrían limitar su uso potencial para la aplicación tecnológica (Salati et al. 2011), sin embargo, una fuente alta de AH (más de 70% p/p) es la leonardita que se utiliza ampliamente hoy en día debido a su abundancia y coste. Por lo tanto, alentamos el uso de los productos derivados de la leonardita en la recuperación de suelos contaminados de hidrocarburos, debido a sus propiedades físico-químicas y contenido de microorganismos hidrocarbonoclastas.

Tabla 19. Composición del combustóleo y el porcentaje de remoción del sistema contaminado con 5000 mgHTP/kg en presencia del CM y AF + CM

Hidrocarburo	Combustóleo 5000 mg/kg	CM	% Remoción	AF + CM	% Remoción
C14	100.62	N/D	N/D	N/D	N/D
Acenafteno	38.02	38.59	0	3.11	91.79
C18	65.33	58.59	10.31	45.86	29.79
C20	526.62	211.61	59.81	162.35	69.17
Fenantreno	314.67	93.46	70.29	107.98	65.68
Fluoranteno	218.72	197.71	9.6	119.96	45.15
C22	27.68	38.29	38.33	21.13	23.64
C24	168.77	115.05	31.83	105.2	37.66
Criseno	16.43	N/D	N/D	N/D	N/D
C26	35.47	52.83	48.94	10.41	70.63
C28	35.05	52.74	50.47	N/D	N/D
Benzo[a]pireno	85.25	50.9	40.29	54.31	36.29
C30	100.15	60.95	39.14	N/D	N/D
C32	36.17	20.53	43.24	N/D	N/D

7.4 Etapa 4

7.4.1 Purificación de los ácidos húmicos

En esta etapa se llevo a cabo la separación de los ah de la materia prima siguiendo el procedimiento que se describió en la **Sección 6.1.4.1.1**. Como resultado del proceso de purificación se obtuvieron 80.16g de ácido húmicos purificados de 500g de muestra inicial (leonardita), lo que indica que la leonardita contiene un 16% de ácidos húmicos. Los AH; así como, los AF purificados se muestran en la

Figura 47.



Figura 47. Ácidos Húmicos y Fúlvicos

7.4.2 Caracterización química

7.4.2.1 Análisis de la acidez de las SH

La acidez de las sustancias húmicas se muestra en la **Tabla 20**. El contenido de grupos carboxilo e hidroxilo por gramo de muestra determina la acidez de las sustancias húmicas y su capacidad para interactuar con moléculas que se encuentren a su alrededor la cual a su vez, está en función de su origen biológico; así como, el grado de madurez del material húmico siendo menor en el caso de los AH.

Tabla 20. Acidez de las sustancias húmicas al pH de trabajo

Ácidos Húmicos	Ácidos Fúlvicos
6.05 meq H ⁺ /g; pH:9	12.641 meq H ⁺ /g; pH:12

La cantidad de meq ó mmol de protones, nos permite realizar un cálculo estequiométrico aproximado de la cantidad de elementos que en teoría pueden reaccionar con el agente alquilante. Así, es posible establecer la cantidad de agente alquilante en base a su peso atómico, densidad y pureza; considerando una interacción 1:1 con la sustancia húmica. De manera análoga se estableció la cantidad de la sal de amonio.

7.4.2.2 Análisis de composición elemental

El análisis elemental de las sustancias húmicas se muestra en la **Tabla 21**. La composición química esta en función al grado de oxidación de la materia orgánica y presentan por tanto diferentes propiedades químicas; así, los AF son solubles en medio ácido y básico. Son la fracción de bajo peso molecular de las SH. Están débilmente aromatzadas, pobremente condensadas y tiene una mayoría de cadenas alifáticas. Están menos polimerizados que los AH (lo cual denota también su color) y generalmente están enriquecidos en grupos funcionales con oxígeno. Mientras que los ácidos húmicos son insolubles en medio ácido y son solubles en medio básico. Son la fracción de alto peso molecular de las sustancias húmicas. Están mayormente condensados y polimerizados.

Tabla 21. Composición Elemental de las Sustancias Húmicas (%)

	Nitrógeno	Carbono	Hidrógeno	Oxígeno+Azufre*
Ácido Fúlvico	0.35±0.05	24.97±4.17	1.52±0.07	73.16
Ácido Húmico	0.5±0.02	42.25±1.26	2.05±0.09	55.2

* obtenido por diferencia aritmética

7.4.2.3 Análisis de los espectros de FTIR

Los espectros FTIR de los AH y AF sin modificar se muestran en la **Figura 48** (H y F). La interpretación de los valores de absorción en el infrarrojo fueron asignados de acuerdo con las convenciones y las tabulaciones en la literatura (**Piccolo et al. 2006**). El espectro de AH y AF contiene una banda ancha centrada a $3670-3200\text{ cm}^{-1}$, derivados de las vibraciones OH- y cadenas alifáticas, y un hombro alrededor de 2500 cm^{-1} de la H-OH de los ácidos carboxílicos. Las bandas entre 2960 y 2850 cm^{-1} se derivan de C-H, CH_3 , CH_2 , $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ alifáticos y sus vibraciones. La fuerte absorción centrada a 1770 cm^{-1} (en los AF) se atribuye a los grupos carbonilo de los ácidos carboxílicos aromáticos. La absorción en 1720 cm^{-1} se atribuye a los grupos carbonilo y el enlace C=O. La absorción alrededor de 1630 y 1540 cm^{-1} puede ser debido a la tensión C=C en anillos aromáticos, tensión asimétrica del $-\text{COO}-$, C=O ó tensión C=C conjugados con grupos carbonilo u otros dobles enlaces. La absorción alrededor de 1420 cm^{-1} puede ser debido a flexión del O-H de alcoholes, ácidos carboxílicos y fenoles, o las deformaciones C-H de grupos $-\text{CH}_2$ y $-\text{CH}_3$. Una banda alrededor de 1240 y 1100 cm^{-1} es una característica de estiramiento C-O de los fenoles, ácidos carboxílicos, ésteres y éteres. Los espectros también contienen una región entre 1620 y 1500 cm^{-1} , lo que es asignado a varios grupos funcionales, por ejemplo, conjugada C=C y vibraciones NO. Finalmente, los espectros presentan señales alrededor de 1620 y 1500 cm^{-1} , los cuales pueden corresponder a la flexión del C-H aromático fuera del plano.

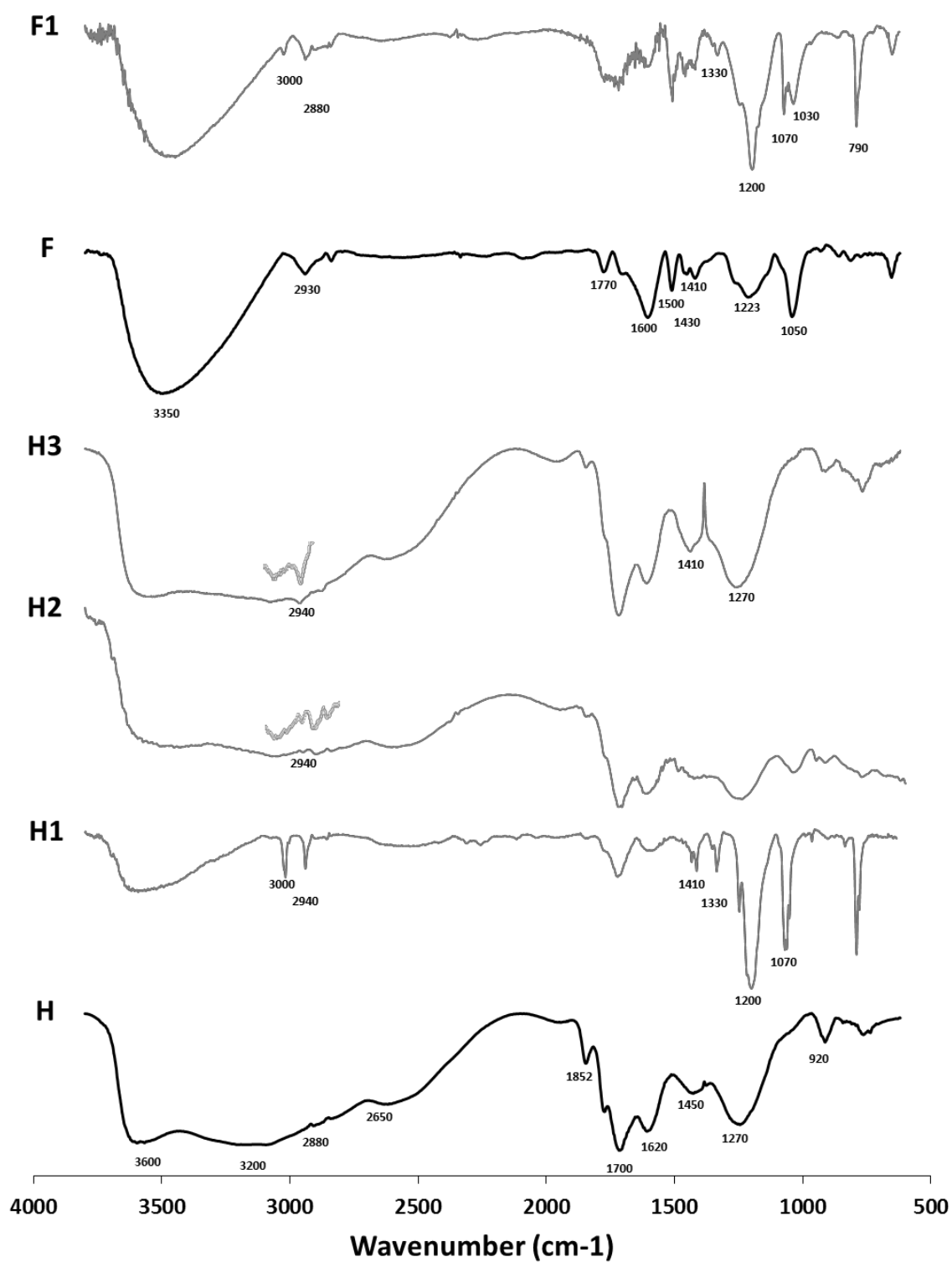


Figura 48. Espectros FTIR de las SH. H: AH sin modificar; H1: A-C12; H2: C-C10 calentamiento con MW; H3: C-C10 calentamiento convencional; F: AF no modificado; F1: A-C10

7.4.2.4 Análisis de los espectros de CPMAS ^{13}C NMR

Los AH presentan un alto contenido de moléculas o grupos funcionales del tipo aromático y bajo contenido de estructuras alifáticas (Figura 49, H y F). Los AF presentaron mayor contenido en estructuras del tipo alifático y de grupos metoxi en enlaces tipo éter o éster, lo que sugiere un alto contenido de grupos presentes en la lignina de los materiales vegetales y corrobora el origen de este tipo de materiales. Ambos presentaron contenido de grupos carboxílicos siendo mayor el contenido en los ácidos húmicos; sin embargo, los ácidos fúlvicos presentaron mayor contenido en estructuras con grupos hidroxilo. Lo cual sugiere un menor estado de oxidación de los ácidos fúlvicos.

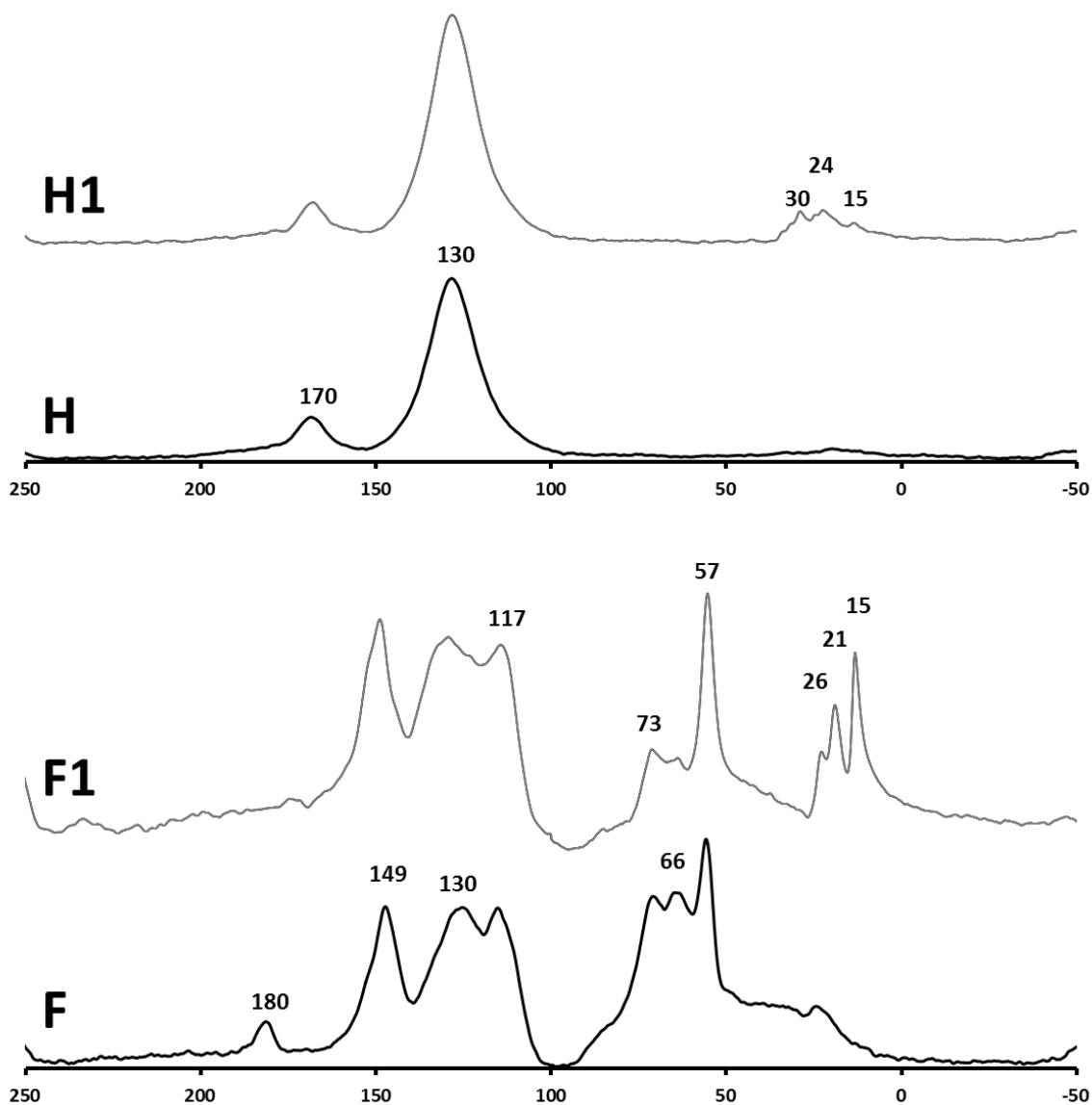


Figura 49. CPMAS ^{13}C RMN del SH. H: AH no modificado; H1: A-C12, F: AF no modificado; F1: A-C10

7.4.2.5 Análisis de los espectros de NMR ^1H

El análisis solo se realizó para los AH debido a que los AF no formaron un sólido lo cual impidió llevar a cabo un análisis fiable (Figura 50). Como se observa los ácidos húmicos contienen algunas señales entre 0.5 – 1ppm de grupos metilo y metileno terminales de cadenas metílicas. Grupos metileno y metilo unidos a anillos aromáticos usualmente tienen resonancia en la región entre 1.8 – 2.6ppm, los cuales se observan también. Una señal amplia también es evidente entre 6 – 10ppm la cual corresponde a protones aromáticos. Otras señales están oscurecidas para la señal del DMSO y la señal de agua. En particular es de importancia hacer notar que en función de la alquilación llevada a cabo se observará un incremento en la señal aromática (si se usa el agente alquilante bromuro de bencilo) o alifática (si se usa los agentes alquilantes yoduro de metilo, bromuro de pentilo) indicando que la reacción se realizó con éxito, en particular la incorporación de grupo alifático C12 se observa.

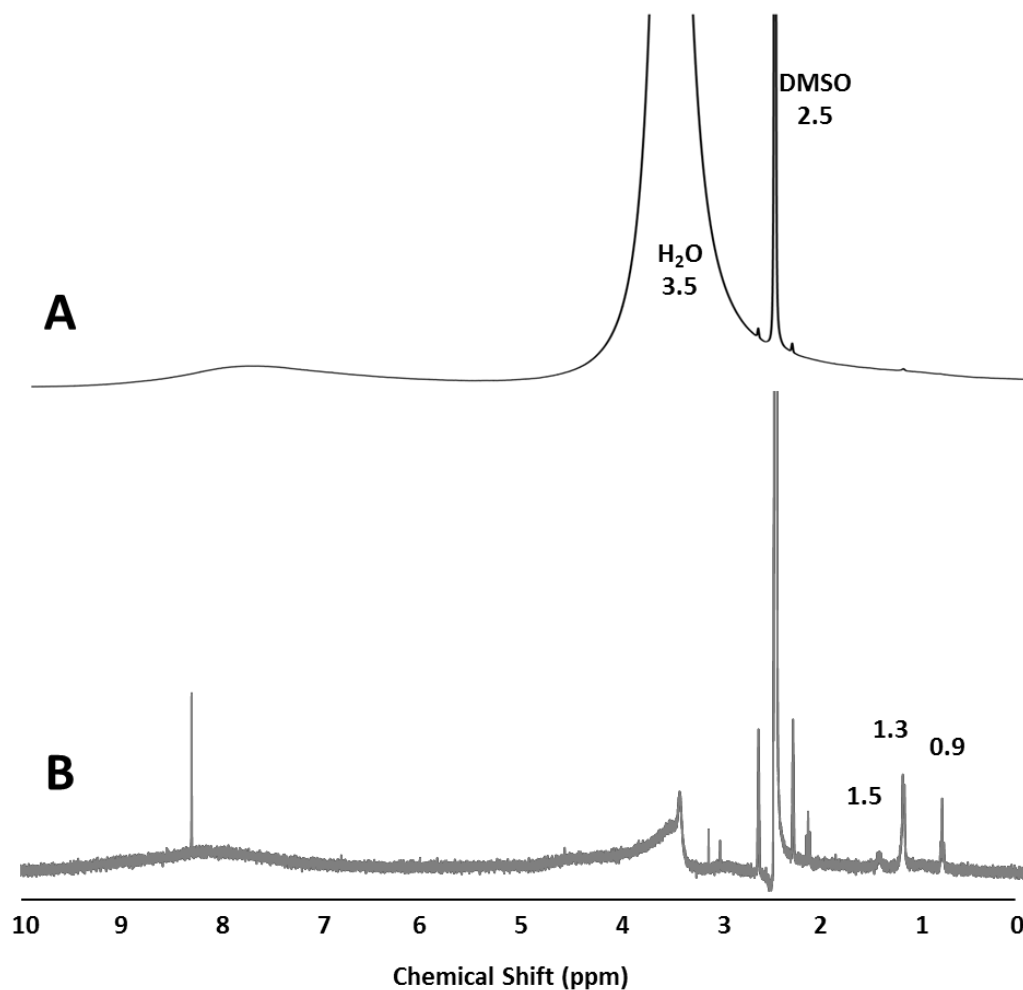


Figura 50. Espectros de H RMN de los AH. A: AH no modificado; B: A-C12

7.4.2.6 Análisis por pirólisis

El análisis de pirólisis indicó que los AH son ricos en moléculas del tipo carbohidratos, fenoles, ácidos grasos y algunos compuestos nitrogenados (**Figura 51, A**); así como, la presencia de alquilbencenos. Por otro lado, los AF presentan mayor contenido en lignina, ácidos grasos de cadena larga y fenoles (**Figura 51, B**).

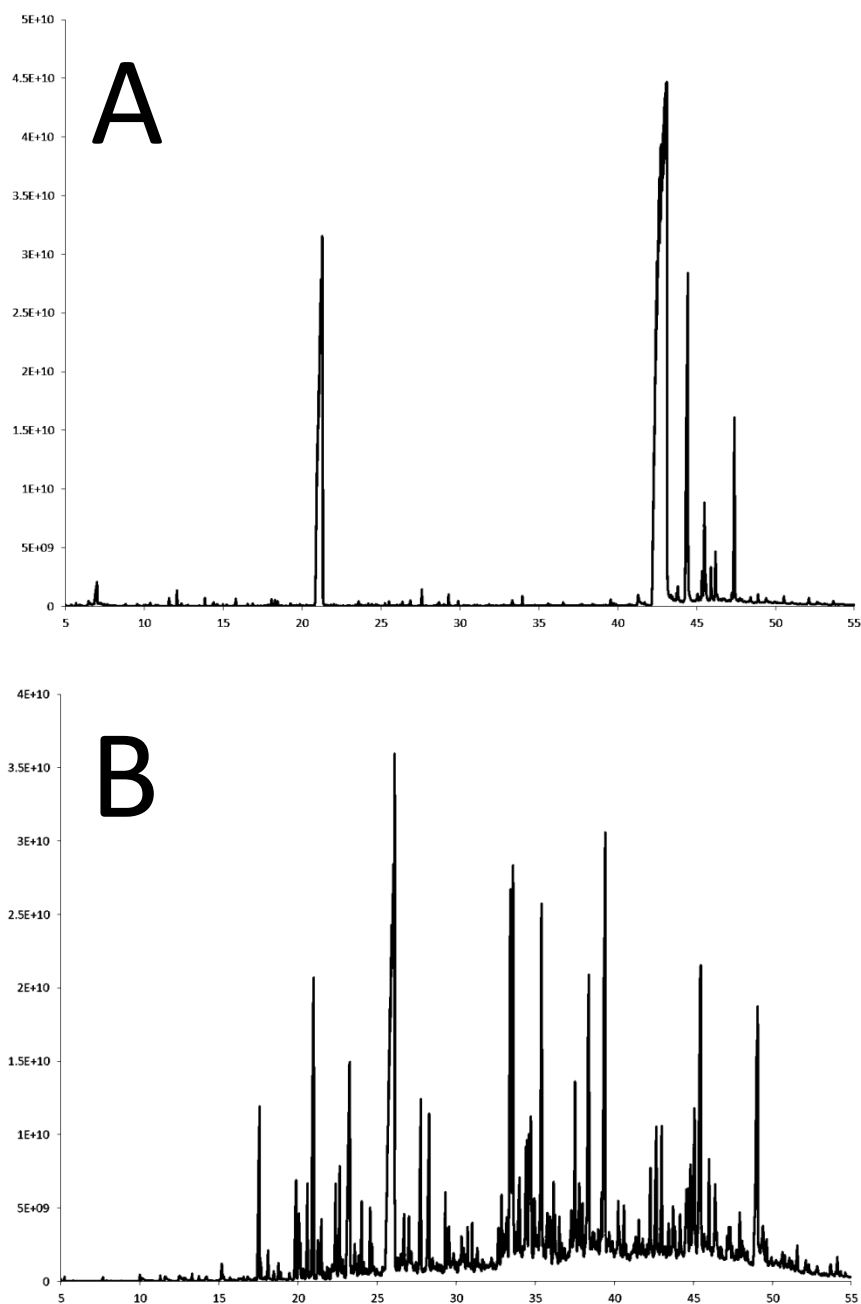


Figura 51. Composición de los AH (A) y AF (B) determinadas por pirólisis.

7.4.3 Modificación química de las SH bajo irradiación de microondas

Con el objeto de aumentar el carácter anfífilo y, en consecuencia, las propiedades tensoactivas de las SH, se llevaron a cabo diferentes modificaciones estructurales de las SH mediante reacciones que permitieran, la incorporación adicional de cadenas alifáticas largas en la estructura. La reacción de esterificación de los ácidos carboxílicos bajo irradiación de microondas ha sido ampliamente estudiada (**Mata-Sandoval et al. 2002, Loupy 2006, Bogdal 2008**); sin embargo, la esterificación de macromoléculas con alto contenido de grupos carboxílico como AH y AF es comparativamente más difícil que las de los grupos carboxílicos ordinarios como consecuencia del impedimento estérico en su estructura. En nuestro caso, la introducción de las cadenas alquílicas de C5 a C18 mediante la esterificación de grupos $-\text{COOH}$ o mediante la formación de éteres de los grupos $-\text{OH}$, utilizando Aliquat 336 o $\text{Bu}_4\text{N}^+\text{OH}^-$ se exploró como catálisis de transferencia de fase o usando el ácido metanosulfónico (**Figuras 48, 49 y 50**). De hecho, diferentes condiciones de reacción (disolventes, temperatura, tiempo, potencia de microondas) fueron evaluadas para obtener las mejores condiciones de reacción y mantener la solubilidad de los derivados o productos.

La alquilación de las SH por cualquiera de las reacciones A, B o C (mencionadas en la **6.1.4.1.4**) conduce a una reducción de la señal en la zona de los ácidos hidroxilo y ácido carboxílico, de acuerdo con el tipo de reacción; aproximadamente a 3400 cm^{-1} y un aumento en la intensidad de la señal C-H a 3040 cm^{-1} , debido a la nueva adición de grupos alquilo. Una señal remanente en 3400 cm^{-1} aparece en el espectro de todos los derivados, lo que indica que algunos grupos $-\text{OH}$ de grupos carboxílicos en los AH, (**Figura 48-H1**) no reaccionaron a la alquilación debido a su reactividad menor. La reacción de esterificación se confirma además de la reducción de la señal $-\text{OH}$ en el desplazamiento de la señal desde 3430 hasta 3570 cm^{-1} ; así como, por la señal de sobre tono CO a 1200 cm^{-1} . Una señal entre 3000 y 2930 cm^{-1} es típica del enlace C-H debido a la presencia de la cadena de alquilo nuevo incorporada. Resultados similares se observan para los AF esterificados en la **Figura 49-F1**. Un mejoramiento sustancial de las vibraciones de flexión de los grupos CH_2 y CH_3 alrededor de 1450 cm^{-1} es evidencia de la introducción de componentes alifáticos en todos los productos alquilados. Bandas adicionales en la región $1000 - 1100\text{ cm}^{-1}$, presentes en los espectros de los AH alquilados pero no en la

del AH original, puede también atribuirse a la deformación C-O y por lo tanto proporcionan evidencia adicional de la mayor contribución de los éteres recién formados.

Una reacción similar empleando AH con decanol se llevó a cabo bajo calentamiento convencional (baño de aceite) (**Figura 48-H3**). En este caso, se requirieron 24 horas para obtener el mismo grado de esterificación respecto a los obtenidos bajo irradiación con microondas (**Figura 48-H2**) de acuerdo con una comparación de espectros de IR cuantitativo. De acuerdo con los resultados, la alquilación usando ácido metanosulfónico muestra los mejores resultados para incorporar los alcanos de cadena larga.

Los espectros de CPMAS ^{13}C RMN de la esterificación de las SH se muestra en la **Figura 49**. Se observa un incremento en 60 ppm que pueden asignarse a los grupos metileno del O-metilo; así como, unas señales prominentes observados entre 26 y 15 ppm se pueden atribuir al $-\text{CH}_3$ terminal (15ppm) y $-\text{CH}_2$ adyacentes (26 ppm) a partir de los grupos alquilo. Estas señales fueron por lo tanto consistentes con la incorporación de grupos alquilo en la AH (**Figura 49-H1**). Los AF modificados mostraron picos en las mismas regiones aromáticas o alifáticas de acuerdo con la reacción llevada a cabo como se muestra en la **Figura 49 (F1, F2)**. Los espectros de H RMN (**Figura 50-B**) mostraron superposición de señales entre 0 y 2 ppm, región característica de protones de los grupos $-\text{CH}_2$ y $-\text{CH}_3$, de lo que puede concluirse que la reacción de alquilación en estas condiciones fue exitosa.

7.4.3.1 Evaluación de las SH modificadas para el lavado del suelo intemperizado contaminado con HTP

El contenido de HTP se determinó por sonicación el cual mostró una concentración inicial de 50000 ± 2500 mgHTP/kg, lo que representa un suelo altamente contaminado. El lavado del suelo llevado a cabo en este trabajo ya sea por las SH sin modificar o las modificadas fueron más eficientes que solo empleando agua en la eliminación de cantidades significativas de contaminantes (**Figura 52 y 53**).

La remoción de HTP por soluciones de SH fue del 61% (AH) y 55% (AF), los cuales representan aproximadamente el 90% y el 72% más que el lavado sólo con agua. Los resultados mostraron que los AF tuvieron casi el mismo rendimiento para remover HTP mediante lavados que los AH, lo que

implicaba el uso potencial de los AF como alternativa en los procesos de remediación. Los resultados anteriores pueden explicarse teniendo en cuenta que las moléculas húmicas contienen muchos anillos aromáticos con grupos carboxilo (-COOH) y fenólicos (-OH); así como, azúcares y péptidos (Tan 2003). Como moléculas de hidrocarburos estas se acercan a las sustancias húmicas, algunas moléculas se unen a la porción aromática de las sustancias húmicas y otras a la parte hidrófoba. Los hidrocarburos alifáticos y/o policíclicos aromáticos se pueden incorporar a las sustancias húmicas mediante la formación de estructuras alrededor del polo hidrófobo de las SH, formando así estructuras similares a micelas (Wijnja et al. 2004) y como consecuencia existe un aumento de la disponibilidad. Los resultados experimentales obtenidos en este trabajo en general están de acuerdo con los reportados previamente para el tratamiento de suelo contaminado con hidrocarburos (Conte et al. 2005)

Encontramos que el lavado sólo con agua sólo removió 32% (Figura 52 o 53), mientras que la adición de AH modificados a 4 g/l (la concentración con el mejor rendimiento) y 2 g/l de los AF modificados aumentó la remoción de los HTP hasta 72% y 68% respectivamente (Figura 52 y 53). La modificación química de las sustancias húmicas ha permitido aumentar la eliminación de los HTP en 18% (para los AH) y 24% (para los AF) más con respecto a los análogos no modificados, presumiblemente mediante el aumento de sus propiedades anfifílicas y la modificación del equilibrio hidrófilo-lipofílico, que mejoró sus propiedades surfactantes. La importancia de promover el uso de las sustancias húmicas que son ambientalmente seguras en la remediación de suelos altamente contaminados debe ser evidente. Las sustancias húmicas pueden incluso mejorar la actividad de la biomasa en suelos lavados y contribuir a una mayor atenuación natural una vez que el suelo se dispone después de un proceso de remediación ex situ (Fava y Piccolo 2002).

Fava et al. (2004) llevó a cabo algunos experimentos para mostrar los efectos de las SH y lecitina de soja en la biorremediación aeróbica de un suelo históricamente contaminado por hidrocarburos aromáticos policíclicos. Observó que las sustancias húmicas son biodegradables, no tóxicas y mejoran la biorremediación aeróbica del suelo aumentando la disponibilidad de HPA; así como, al favorecer la aparición y persistencia de bacterias especializadas en la biodegradación de HPA en biopilas. Es importante contrastar los beneficios de usar las SH (agente tensioactivo natural) en lugar de los tensioactivos sintéticos. El rendimiento de lavado de suelo es directamente proporcional a la

concentración de monómero disponible en la fase acuosa que se relaciona directamente con la sorción del suelo y el contenido de carbono orgánico.

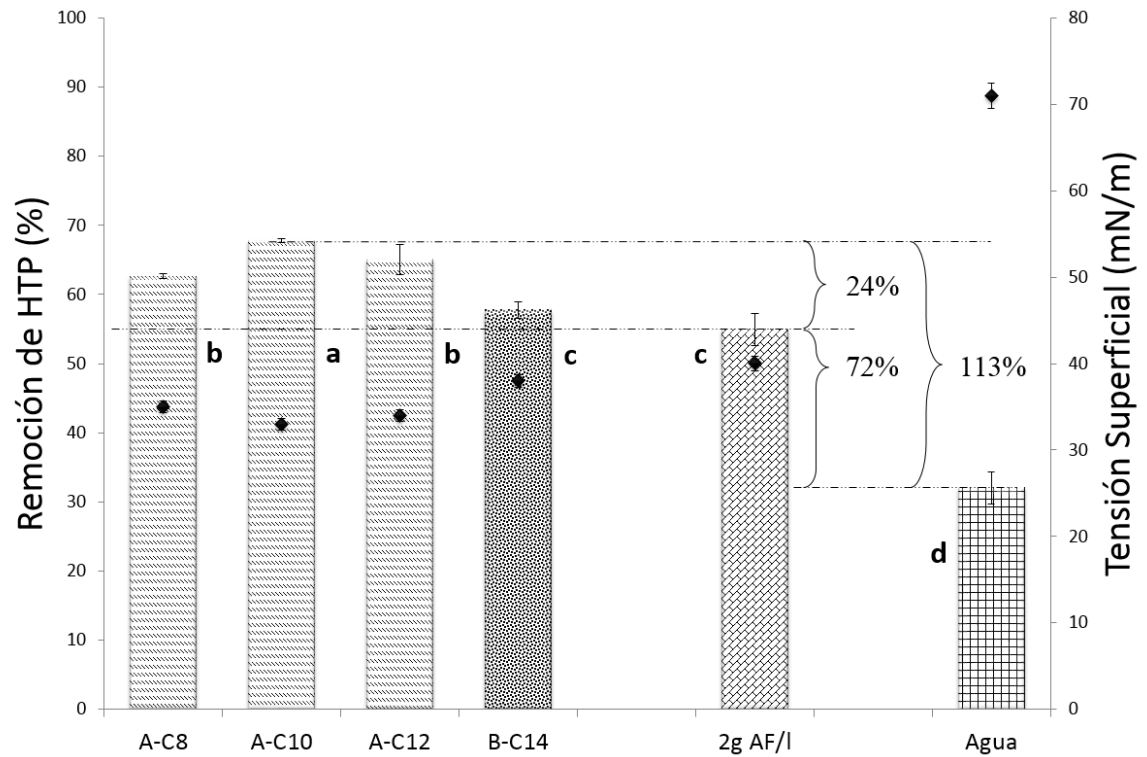


Figura 52. Remoción de HTP por AH no modificados/modificados. A: reacción con alcoholes; B: reacción con haluros de alquilo. Mismas letras significan que no hay diferencias estadísticas significativas $P < 0.05$.

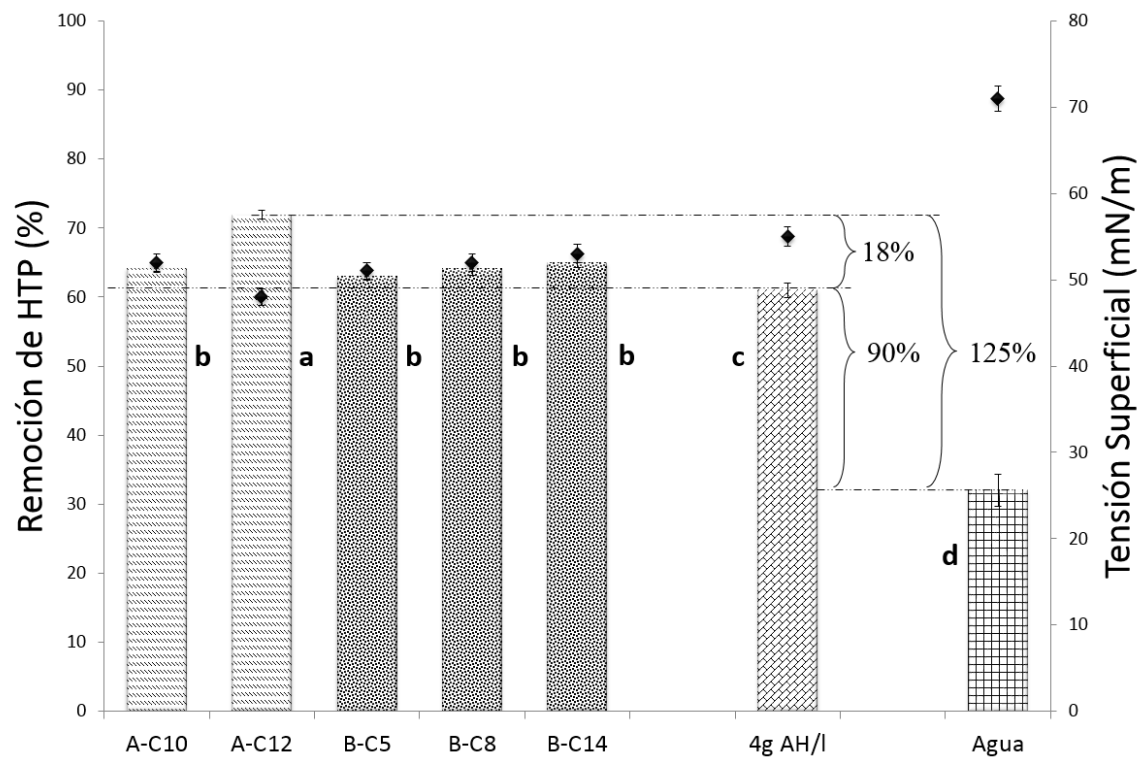


Figura 53. Remoción de HTP por AF no modificados/modificados. A: reacción con alcoholes; B: reacción con haluros de alquilo. Mismas letras significan que no hay diferencias estadísticas significativas $P < 0.05$.

Laha et al. (2009) indicó que en presencia de suelo, la dosis de tensoactivo requerida para la formación de micelas es mayor debido a la partición de tensoactivo en el suelo; una consecuencia de su naturaleza anfifílica. Las pérdidas de agente tensoactivo sintético debido a la adsorción en el suelo se estimaron alrededor del 97% de la dosis total y sólo 3% existente en forma monomérica en la fase acuosa para la eliminación de contaminantes (**Chu et al. 2001**) hecho que tiene un impacto directo en el rendimiento, eficiencia y coste del tratamiento. El grado de absorción de tensoactivo en suelo depende principalmente de la fracción de carbono orgánico del suelo y de la naturaleza química del agente tensoactivo (**Harwell et al. 1999**). Esto sugiere que cuanto mayor sea el contenido de materia orgánica del suelo, mayor es la dosis de tensoactivo requerida para la solubilización contaminante. Las pérdidas de tensoactivo debido a la sorción, necesitan ser consideradas al seleccionar dosis de surfactante para las operaciones de limpieza del suelo o acuífero.

Existe otro problema relacionado con el uso de agentes tensoactivos sintéticos, que es la interacción con las SH en solución. **Cho et al. (2002)** demostraron el efecto de la SH y surfactantes sintéticos (SDS y Triton-X100) en la solubilidad aparente de los HPA. Ellos observaron un efecto negativo sobre la solubilidad HPA cuando ambos tensoactivo estaban involucrados, mientras tanto cualquiera de los tensoactivos probados por sí solos, no mostraron efectos adversos sobre la solubilidad aparente de los HPA. Sus resultados mostraron que cuando las SH y el SDS se disuelven en agua, los grupos funcionales de las sustancias húmicas, tales como los grupos carboxílicos y fenólicos, pueden ser deshidrogenados; mientras que el SDS es ionizado en iones de sodio y su agente tensoactivo aniónico. La formación de pares de iones entre el catión de sodio y los grupos cargados negativamente aumenta la esfera de hidratación del ácido o grupos fenólicos, lo que disminuye el tamaño efectivo de la porción hidrófoba de la molécula de las SH.

Como complemento en el estudio, **Cho**, realizó un experimento añadiendo soluciones de NaCl y CaCl₂ en presencia de SH mostrando se ven afectadas por la fuerza iónica. En contraste, **Chen y Wong (2006)**, observaron que no hay interacciones adversas entre la materia orgánica disuelta y el agente tensoactivo Tween 80 (agente tensoactivo no iónico) sobre la desorción de HPA, sino todo lo contrario. Es importante destacar en este momento que los derivados de AH fueron capaces de permanecer solubles en agua de mar, mientras que los no modificados no.

Un problema relacionado con las propiedades de complejación de los AH es que producen una coagulación a cierta fuerza iónica (más precisamente la fuerza de cationes). Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a lo reportado en la literatura. Con el fin de suprimir la coagulación de la AH en soluciones acuosa [Terashima et al. \(2007\)](#), unió a los grupos carboxilo de los AH, aminas hidrofílicas, como la glucosamina o taurina, mediante enlace amida. Los resultados obtenidos en este trabajo indicaron de nuevo que la coagulación de AH se suprime mediante la modificación de los grupos funcionales de las sustancias húmicas, tales como los grupos carboxílicos y fenólicos, lo cual aumenta en gran medida su aplicación en ambientes contaminados marinos o con alta fuerza iónica.

Los AH modificados mostraron un mejor desempeño que los análogos de los AF, siendo el AH-C12 ([Figura 52-A-C12](#)) y AF-C10 ([Figura 53-A-C10](#)) los productos con un mayor rendimiento en la remoción de HTP. Es posible observar que hay un comportamiento de acuerdo con la longitud de alcano que se incorpora en las SH. La remoción HTP por los derivados de AH y de acuerdo con su grupo alquilo añadido fue: C5/3%; C8/5%, C10/5%; C12/18% y C14/7% más que los AH sin modificar, mientras que la remoción de HTP por derivados de los AF fue: C8/14%; C10/24%; C12/18 y C14/5%.

La capacidad de remoción de HTP por los derivados de AF fue superiores a los derivados de los AH, tal vez como consecuencia de una mayor eficiencia en la alquilación debido a su estructura menos compleja. La adición de los grupos alquilo podría haber modificado la estructura supramolecular de las SH ([Piccolo 2002](#)) y su flexibilidad (debido a las largas cadenas de alquilo incorporados) ayudando a la interacción entre el los HTP y el núcleo hidrofóbico de la molécula anfifílica. En efecto un mayor contenido de cadenas alquilo aumenta la hidrofobicidad de los AH, el aumento de la energía libre del sistema agua/tensoactivo puede ser reducido anticipando el proceso de formación de micelas ([Quadri et al. 2008](#)). [Salati et al. \(2011\)](#) indicaron que la habilidad de los AH para disponerse asimismo con el fin de tener sus grupos internos hidrófobos (hidrocarburos) y las porciones hidrófilas hacia el exterior, tales como carboxilo, fenoles y grupos hidroxilo, depende de la longitud y la flexibilidad de sus cadenas constituyentes. [Chilom et al. \(2009\)](#) hizo un experimento en el que la combinación de una extracción alcalina y un solvente orgánico permitió dividir a los AH en dos tipos de fracciones de AH (HA1 y HA2) y un tipo de fracción lipídica (L). La fracción HA1 no parece estar implicada en las propiedades tensoactivas de los AH.

Por otro lado, la fracción HA2, mostró una fuerte actividad superficial y jugó un papel en la iniciación en el proceso de agregación de los AH y se informó estar íntimamente ligados con la fracción de lipídica (L) que parece ser responsable de la formación de micelas. Estas investigaciones mostraron la importancia de la fracción alifática en la estructura supramolecular de las SH y justificaron la mejora del comportamiento surfactante de los derivados de las SH.

En concreto, los AH del suelo (este conocimiento se aplica a la leonardita también, como hemos demostrado en este trabajo) contienen menos grupos alifáticos y más aromáticos que los AH obtenidos a partir de biomasa (es decir, composta, lodos, estiércol en forma de lodo, residuos sólidos municipales, residuos verdes o plantas), además los AH del suelo muestran la presencia de anillos aromáticos más condensados o sustituido que los AH de biomasa ([Chai et al. 2007](#)). [Salati](#), mencionó que el uso de fuentes ricas en AH, como los materiales a base de carbón (por ejemplo leonardita, lignito) o turba, permite utilizarlos en aplicaciones industriales, pero estas fuentes fósiles no son renovables y no tienen buenas propiedades surfactantes cuando son comparadas con las fuentes pobres de AH como la composta, lodos, estiércol líquido y etc.

Es cierto que las fuentes de ricas en SH como la leonardita, utilizadas en este trabajo, no son renovables, pero el costo y el rendimiento de las SH justifica en parte el tiempo requerido para obtener una alta cantidad de SH en comparación a fuentes pobres en SH, además con la modificación química de las SH, tal como se propone en este trabajo, permitirá obtener casi las mismas propiedades físicas y químicas en sólo una fracción de tiempo u obtener SH con propiedades deseadas. Otra forma de obtener SH con propiedades deseadas fue propuesta por [Francioso et al. \(2000\)](#). Ellos reportaron que suelo enmendados a largo plazo con estiércol de ganado favorece la acumulación de carbono orgánico total, lo que lleva a un aumento de las cadenas alifáticas y grupos carboxilo en los AH, en comparación con otras enmiendas. El experimento consistió en varias parcelas de terreno tratados durante un período de 22 años (1972-1994) con diferentes enmiendas: estiércol de ganado, lodos de vaca y residuos de cultivos.

Sin embargo, el hecho de que es posible modificar la composición química de las SH con el fin de obtener algunas con propiedades o contenido deseado, mediante este proceso, requiere mucho tiempo. De hecho, la CMC de las SH obtenidas mediante nuestra propuesta (medido con un tensiómetro TD-1C LAUDA) disminuyó alrededor de 5 mN/m la tensión superficial a partir de un valor inicial del 45 a 40 mN/m en los AH y de 40 a 35 mN/m en de los AF en la concentración probada (AH: 4 g/l y AF: 2 g/l).

En resumen, con la modificación propuesta en este trabajo logramos: agregar grupos alquilo de cadena larga en minutos, evitar la coagulación/precipitación de los AH en agua de mar, disminuir el valor inicial de la CMC y mantener la solubilidad de todos los productos modificados en agua corriente. Por lo tanto, el uso de SH modificadas como agentes potenciadores de la disponibilidad de contaminantes parece prometedor para la remediación de HTP de suelos contaminados. Estas observaciones demuestran la eficacia de lavado del suelo con tensoactivos y sugieren que el interés en las SH no sólo reside en la habilidad de mejorar la disponibilidad de los hidrocarburos a un costo relativamente bajo, sino también en su propia biodegradabilidad intrínseca y no toxicidad. Este es y la ventaja adicional de su origen biológico, lo que hace que su incorporación en suelos contaminados sea socialmente más aceptable que la de los agentes sintéticos.

7.4.4 Esterificación de las SH mediante catálisis de transferencia de fase (método modificado)

Inicialmente se realizó el cálculo estequiométrico de la reacción empleando como base los meq ó mmol de protones de las sustancias húmicas. Tomemos como base el caso de los ácidos húmicos; estos tienen 6.05 meq H⁺ ó mmol H⁺ por lo tanto si queremos adicionar en una proporción del 100% un agente alquilante como el bromuro de bencilo solo basta determinar el peso molecular y la densidad para obtener el número de moles necesarios; es decir, 6.05mmol. La adición de la solución de NaOH, es necesaria debido a que el ácido húmico después del proceso de purificación se encuentra muy protonado e insoluble en agua. Se debe mencionar que una vez terminada la reacción de acuerdo al protocolo propuesto por [Piccolo \(2006\)](#) el producto debe ser llevado a pH 1 debido a que de esta manera los ácidos húmicos son insolubles y es posible lavar el producto (siempre y cuando se

mantenga la acidez del agua de lavado), por lo que el producto final está altamente protonado. Así mismo, se consideró que el cambio de pH podría afectar la reacción por lo que se decidió llevar el producto a pH 9 después del lavado y se liofilizó. Es necesario indicar que todos los ácidos húmicos presentan una estructura y composición diferentes; por lo tanto, las propiedades fisicoquímicas son diferentes, por lo que no necesariamente todos los ácidos húmicos reaccionaran de la misma manera.

Se eligió trabajar con el **bromuro de bencilo** inicialmente dado que la incorporación de del grupo bencilo a la estructura del ácido húmico debería ser visible por encima de 3000 cm^{-1} , región de las señales aromáticas. Las condiciones de reacción iniciales se muestran en le **Tabla 22, R1**. La reacción resultante se muestra en la **Figura 54**. Como podemos observar la reacción se llevó a cabo con éxito, ya que, el espectro de FTIR mostró la presencia de las señales aromáticas por encima de la región de 3000 cm^{-1} .

7.4.4.1 Optimización de la reacción

Se optimizó la reacción modificando las variables implicadas en la reacción (**Tabla 22**), modificando la temperatura de lavado y numero de lavados del producto final para remover la mayor cantidad posible de la sal cuaternaria empleada. Posteriormente se determinó la cantidad mínima de agente de transferencia de fase (hidróxido de tetrabutilamonio, HTBA) y el volumen de tetrahydrofuran (THF) requerido. Finalmente se evaluó tanto el tiempo como la temperatura de reacción.

Tabla 22. Modificación de las variables de reacción en el mejoramiento del proceso de O-alkilación

Variables de reacción	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
	<i>Cantidad</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Cantidad</i>
HA	500 mg	500 mg	500 mg	500 mg	500 mg	500 mg	500 mg
NaOH (1.5M)	1.1 mL	1.1 mL	1.1 mL	1.1 mL	1.1 mL	1.1 mL	1.1 mL
Agua	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
HTBA	5.5 mL	5.5 mL	400 μL	400 μL	400 μL	400 μL	200 μL
THF	20 mL	20 mL	20 mL	sin			
Haluro de alquilo (PhCH₂Br)	360 μL	360 μL	360 μL	360 μL	360 μL	360 μL	360 μL
Lavado (60°C)	2 veces						
Lavado (10°C)		5 veces	5 veces	5 veces	5 veces	5 veces	5 veces
Tiempo de reacción	Toda la noche (16h aprox.)	Toda la noche (16h aprox.)	Toda la noche (16h aprox.)	Toda la noche (16h aprox.)	72h	24h	24h
Temperatura de reacción	Temperatura ambiente	Temperatura ambiente	Temperatura ambiente	Temperatura ambiente	Temperatura ambiente	45°C	45°C

7.4.4.1.1 Número de lavados

Como consecuencia de los resultados obtenidos, se comenzó la optimización del proceso con el número de lavados necesarios para eliminar la sal cuaternaria, así, se decidió lavar más de dos veces el producto final (manteniendo el pH en 1). Podemos observar que el efecto del lavado remueve la sal cuaternaria al observarse una disminución de la señal en el área alifática para este compuesto (**Figura 54, A1-A3**). Aunque el producto se lavó 8 veces, entre 5 y 6 lavados la señal no presenta cambios, por lo que se decidió establecer 5 lavados para el producto final (**Tabla 22, R2**). Cabe indicar que se comenzó a trabajar 24h de reacción.

7.4.4.1.2 Cantidad de HTBA

Otro parámetro a considerar es la cantidad de sal cuaternaria, por lo que se decidió modificar la relación HTBA/AH desde la relación original en mmol que fue de 2/1 hasta 1/100, los resultados se muestran en la **Figura 54** en los espectros **B1-B3**. Podemos observar que es posible reducir la cantidad de HTBA hasta una relación 1/5 que representa adicionar solo 400 μ L, así, la reacción se volvió a modificar (**Tabla 22, R3**).

7.4.4.1.3 Cantidad de THF

El disolvente tetrahidrofuran (THF) tiene la finalidad de disolver y dispersar el haluro de alquilo el cual es insoluble en agua, de esta manera permite incrementar la interacción con la sal cuaternaria de amonio y permite la formación de la interfase para que se lleve a cabo la reacción de catálisis de transferencia de fases. De manera análoga al procedimiento para establecer la cantidad de HTBA, se realizó considerando en esta ocasión la relación H₂O/THF. De acuerdo a los resultados es posible reducir la cantidad de THF en 25, 50, 75, 95% e inclusive en ausencia completamente se llevó a cabo la

reacción (**Figura 54, C1- C2**), dando como consecuencia la reacción R4 (**Tabla 22, R4**), en la cual se elimina la adición de THF.

7.4.4.1.4 Tiempo de reacción

El tiempo de reacción es un parámetro muy importante al momento de llevar a cabo una reacción de cualquier índole, por ello se decidió trabajar un tiempo de reacción comprendido entre 7 horas hasta 5 días, los resultados se muestran en las **Figura 54, D1-D3**. La reacción a las 7 horas ha comenzado a interaccionar pero muy pobremente; sin embargo, hasta las 72 horas deja de incrementarse la eficiencia de reacción, por lo que se modificó las condiciones de reacción (**Tabla 22, R5**).

7.4.4.1.5 Temperatura de reacción

La temperatura permite incrementar rendimiento y disminución de tiempos de reacción, por lo que también se consideró en la optimización. Se consideró una temperatura de 45°C debido a que si se incrementa mucho los enlaces tipo éster son inestables a temperaturas superiores. Los resultados se muestran en la **Figura 54, E**. La temperatura mejoró ligeramente la señal del espectro, así como, el tiempo de reacción como se aprecia en el espectro.

Se determinó nuevamente el tiempo de reacción, en donde 24 h de reacción permiten obtener resultados muy similares a los obtenidos a las 72 h de reacción (**Tabla 22, R6**). Se realizó un experimento extra que consistió en reducir nuevamente la concentración de HTBA considerando que la reacción se había optimizado. Así, fue posible reducir a 200 μ l la cantidad de HTBA en la reacción (**Tabla 22, R7**).

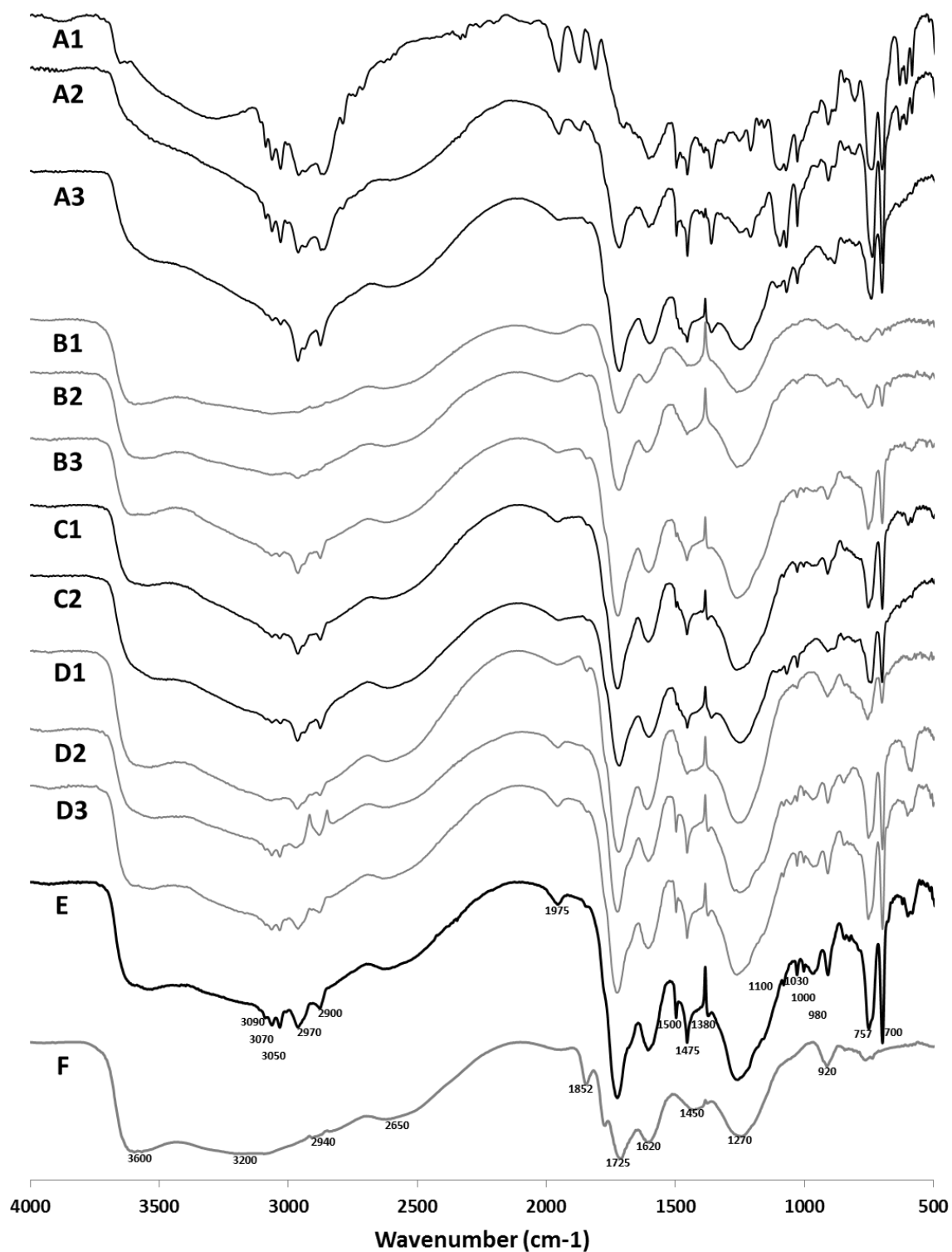


Figura 54. Espectros de IR del proceso de mejora de la reacción de O-alkilación de AH. A1-A3: Efecto de los lavados (0, 2, 5 veces); B1-B3: Cantidad de HTBA (1:100, 1:10, 1:5); C1-C2: Cantidad de THF (10:1, sin THF); D1-D3: Efecto del tiempo (7, 15, 24h); E: Efecto de la temperatura (45°C); F: Ácido Húmico sin modificación estructural.

Estos resultados contrastan con los obtenidos por [Piccolo \(2006\)](#) los cuales se muestran en la [Figura 55](#), en donde podemos apreciar que la intensidad de las señales fue más baja, lo que indica que realizamos una correcta optimización de la reacción.

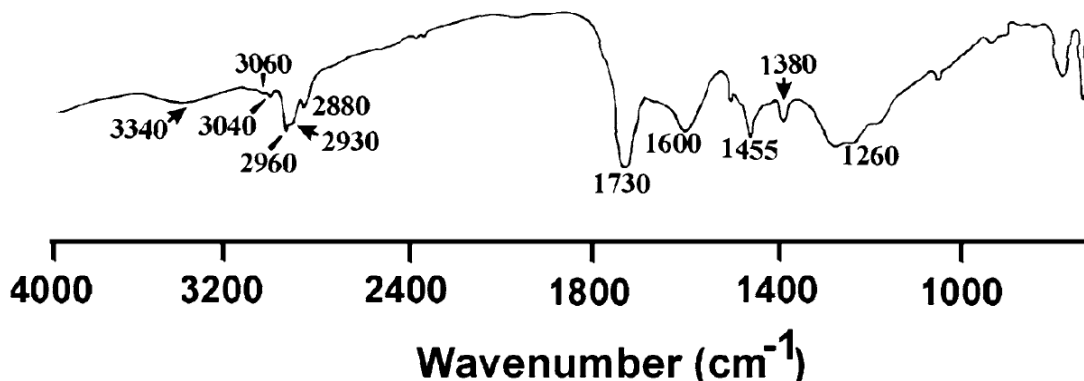


Figura 55. Espectro del producto de reacción 1 usando bromuro de bencilo (Piccolo, 2006)

7.4.4.1.6 Concentración de haluro de alquilo

Finalmente se estableció la concentración de los haluros de alquilo los cuales se añadieron a la solución en un 40, 60 y 80% con relación al contenido molar de protones ácidos en los AH ([Figura 56, I1-I9](#)). La alquilación conduce a una reducción sustancial en la absorción de la región hidroxilo aproximadamente a 3600 cm⁻¹ y un aumento sustancial en la intensidad de la C-H que se extiende a frecuencias en el rango de 2900 cm⁻¹ y superiores, debido a los grupos recién unidos alquilo en la caso de la metilación ([Figura 56, I1-I3](#)) y pentilación ([Figura 56, I4-I6](#)). Una mejora sustancial de las vibraciones de flexión de CH₂ y CH₃ de los grupos entre 1475 cm⁻¹ es evidencia de la introducción de componentes alifáticos en todos los productos alquilados. La adición del grupo bencilo a la estructura del AH debe ser visible por encima de la región de 3000 cm⁻¹ en la región aromática, como es posible ver en el espectro ([Figura 56, I7-I9](#)). Bandas adicionales en la región entre 1000-1100 cm⁻¹, de los espectros de lo AH alquilados, que no se observan en los AH originales, puede también atribuirse a la deformación C-O, y proporcionan evidencia adicional de la mayor contribución de los recién formados éteres. La alquilación aumenta la señal de absorbanza de acuerdo con el contenido mola

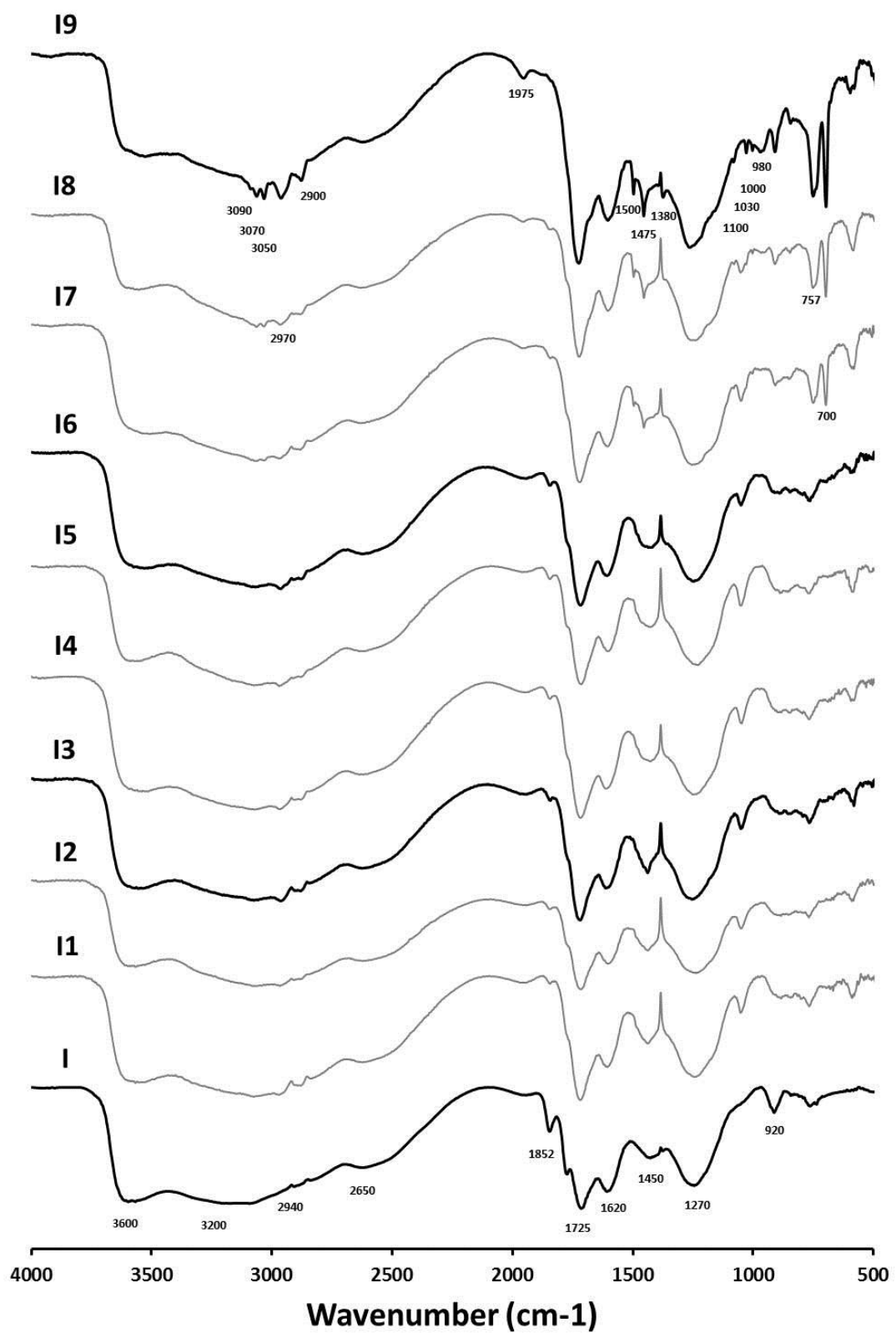


Figura 56. Espectro de Infrarrojo de los espectros alquilados de los AH. I1-I3: Metilación (40, 60 y 80%, respectivamente); I4-I6: Pentilación (40, 60 y 80%, respectivamente); I7-I9: Bencilación (40, 60 y 80%, respectivamente); I: AH sin modificación química.

7.4.4.1.7 Ácidos Fúlvicos

Los AF son soluble en todo el rango de pH por lo que al llevar a cabo la reacción, se observó un precipitado en la solución por encima de la incorporación de un 50% de agente alquilante; presumiblemente como consecuencia de la modificación estructural y no solo por efecto de la incorporación de los grupos alquilo. El objetivo del proceso de modificación es mantener la solubilidad del producto por lo cual no se trabajó con concentraciones superiores. Estos productos se analizaron y se observó la aparición de señales características de los grupos funcionales bencilo, pentilo y metilo como se observa en la **Figura 57 (A1, B1 y C1)**. Al adicionar HCl al 10% a la mezcla de reacción se obtuvo un precipitado el cual se lavó 5 veces de acuerdo al protocolo de purificación establecido para los AH. Los resultados indican nuevamente que existió una modificación de los grupos funcionales como se observa en los espectros A2, B2 y C2. Finalmente también se analizó el AF que permaneció en solución después de la adición de HCl, liofilizando el producto y se observó que este también presentó la modificación estructural (espectros A3, B3 y C3).

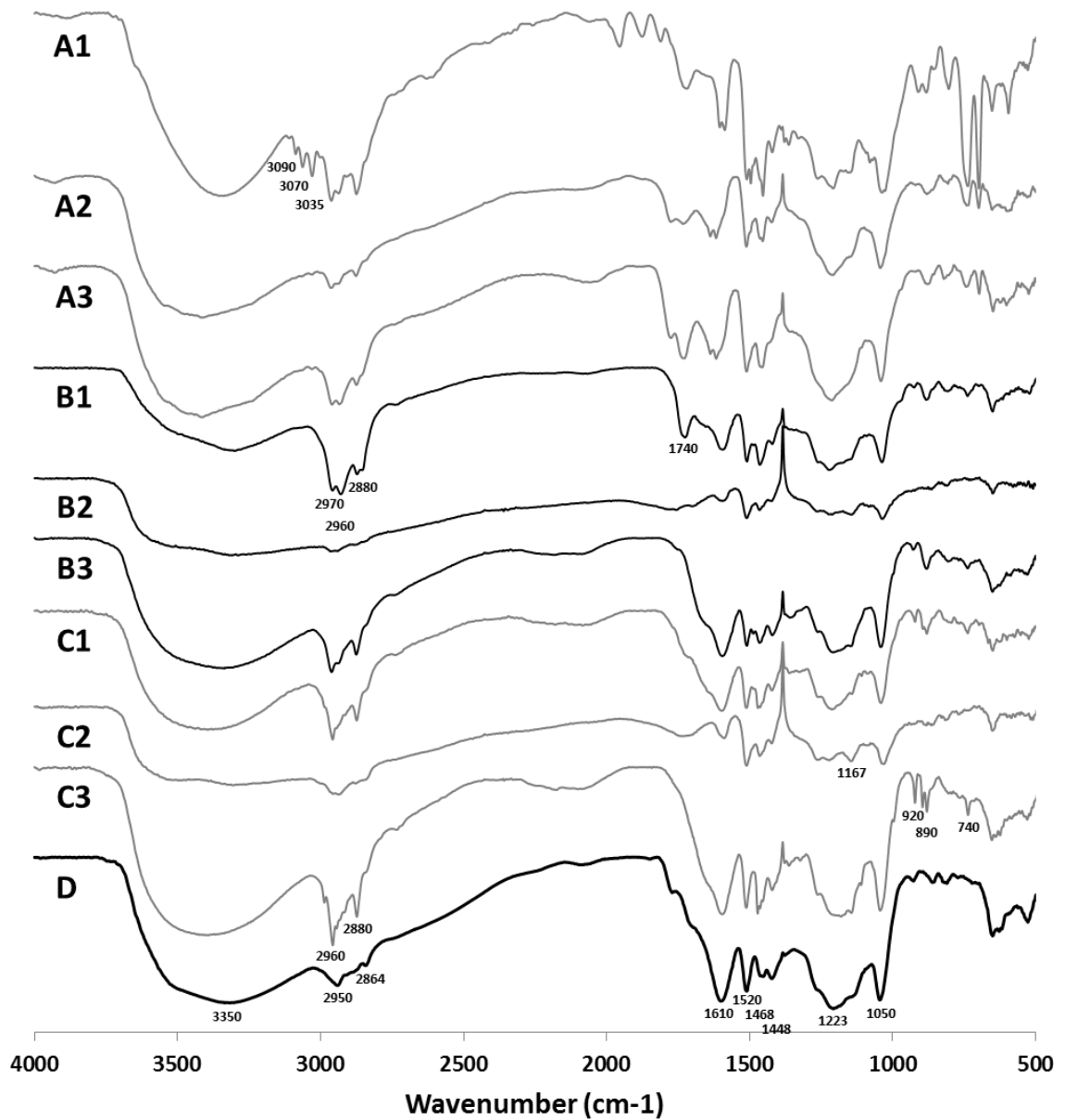


Figura 57. Espectros de IR del proceso de mejora de la reacción de O-alkilación de AF; A1-A3: Benzilación (precipitado, precipitado con HCl, solución); B1-B3: Pentilación (precipitado, precipitado con HCl, solución); C1-C3: Metilación (precipitado, precipitado con HCl, solución); D: Ácido Fúlvico sin modificación estructural.

7.4.4.2 Caracterización de los derivados

7.4.4.2.1 MNR ^1H

En particular, es de importancia destacar que dependiendo de la alquilación que se lleva a cabo, una señal adicional en la zona aromática cuando se emplea un agente aromático (bromuro de bencilo) o una señal en la zona alifática cuando se usan agentes alifáticos (yoduro de metilo, bromuro de pentilo) indica que la reacción tuvo éxito (**Figura 58, H1 -H9**).

La bencilación de los AH mostró un aumento de la señal entre 6.5 y 8 ppm con un multiplete ancho centrado a 7.4ppm, resultante de los protones aromáticos de los grupos bencilo incorporados (**Figura 58, H1-H3**). Estos resultados son complementarios a una señal de ancho entre 4.5 y 5.4 ppm, que es una región de metilenos $-\text{CH}_2\text{O}$ incorporada con la bencilación. Esta región es consistente con los grupos de metileno en los desplazamientos químicos bencil ésteres y éteres de bencilo aromáticos. Así, es posible demostrar que la reacción se llevó a cabo con éxito en todas las concentraciones ensayadas. Además, en el caso de la reacción con yoduro de metilo (**Figura 58, H4-H6**), el espectro muestra una señal de un multiplete ancho con un máximo a 3.9 ppm. Esta señal es característica de los grupos $-\text{OCH}_3$ asociados con ésteres de metilo y grupos metoxi de anillos aromáticos como resultado de la incorporación de grupos metilo de la reacción de alquilación. Sin embargo, la señal fue muy débil que indica una baja eficiencia de reacción. La reacción de pentilación (**Figura 58, H7-H9**) mostró superposición de señales entre 0 y 2 ppm la cual es una región característica de protones de los grupos $-\text{CH}_2$ y $-\text{CH}_3$. Estas señales se observaron en este y los otros espectros lo cual puede ser debido remanentes de la sal cuaternaria y de la reacción llevada a cabo.

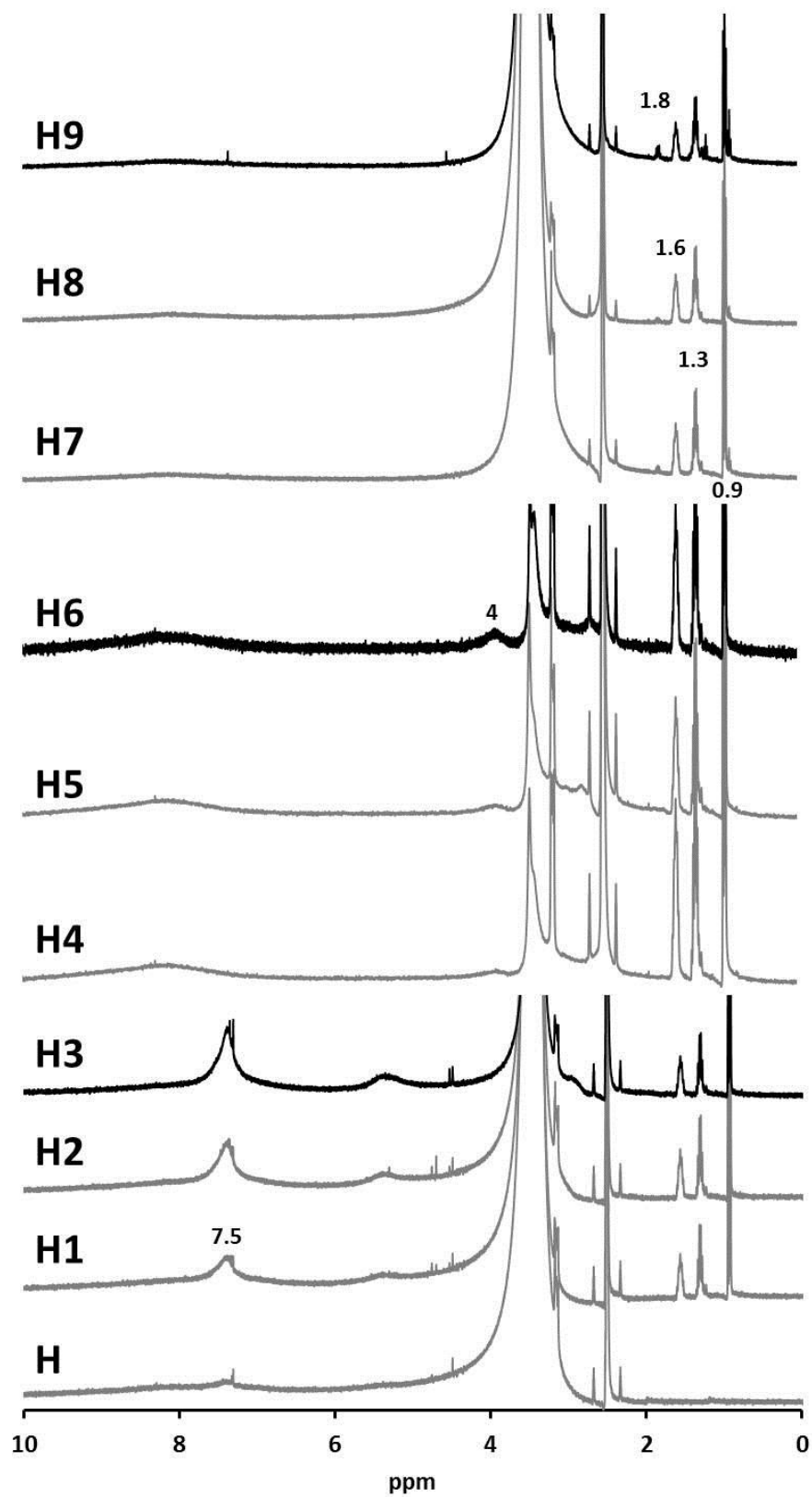


Figura 58. Espectro NMR ^1H de la alquilación de los AH. H1-H3: Bencilación (40, 60 y 80%, respectivamente); H4-H6: Metilación (40, 60 y 80%, respectivamente); H7-H9: Pentilación (40, 60 y 80%, respectivamente); H: AH sin modificación química

7.4.4.2.2 CPMAS ^{13}C NMR

Los espectros de la alquilación de AH se muestran en la **Figura 59**. El análisis se realizó sólo para los derivados de los AH de 40 y 80%. Los AH tienen un alto contenido de grupos funcionales de moléculas de tipo aromático y bajo contenido de estructuras alifáticas. Se observa un incremento en 60 ppm que pueden asignarse a los grupos metileno del O-metilo del pentilo. Señales prominentes observadas entre 26 y 15 ppm se pueden atribuir al CH_3 terminal (15 ppm) para los derivados de metileno (**Figura 59, C1-C2**) o CH_2 adyacentes (26 ppm) del grupo pentilo. Estas señales fueron por lo tanto compatibles con la incorporación de grupos pentilo en los AH (**Figura 59, C3-C4**). La RMN mostró que tuvo éxito la incorporación de grupos metilo y bencilo.

El espectro de los productos bencilados de AH (**Figura 59, C5-C6**) muestra una señal de entre 100 y 150 ppm con un pico centrado en 130 ppm. Esta señal está fuertemente relacionada con la contribución de los átomos de carbono aromáticos altamente protonados, con la señal más alta en comparación con los AH sin modificar. Esta señal fuerte proporciona una fuerte evidencia para la incorporación de los grupos bencilo en los AH mediante enlaces covalentes. También, como se esperaba, la señal de metileno O- CH_2 -Ph asociada con la formación de éster y éter se observó un pico centrado en 67ppm.

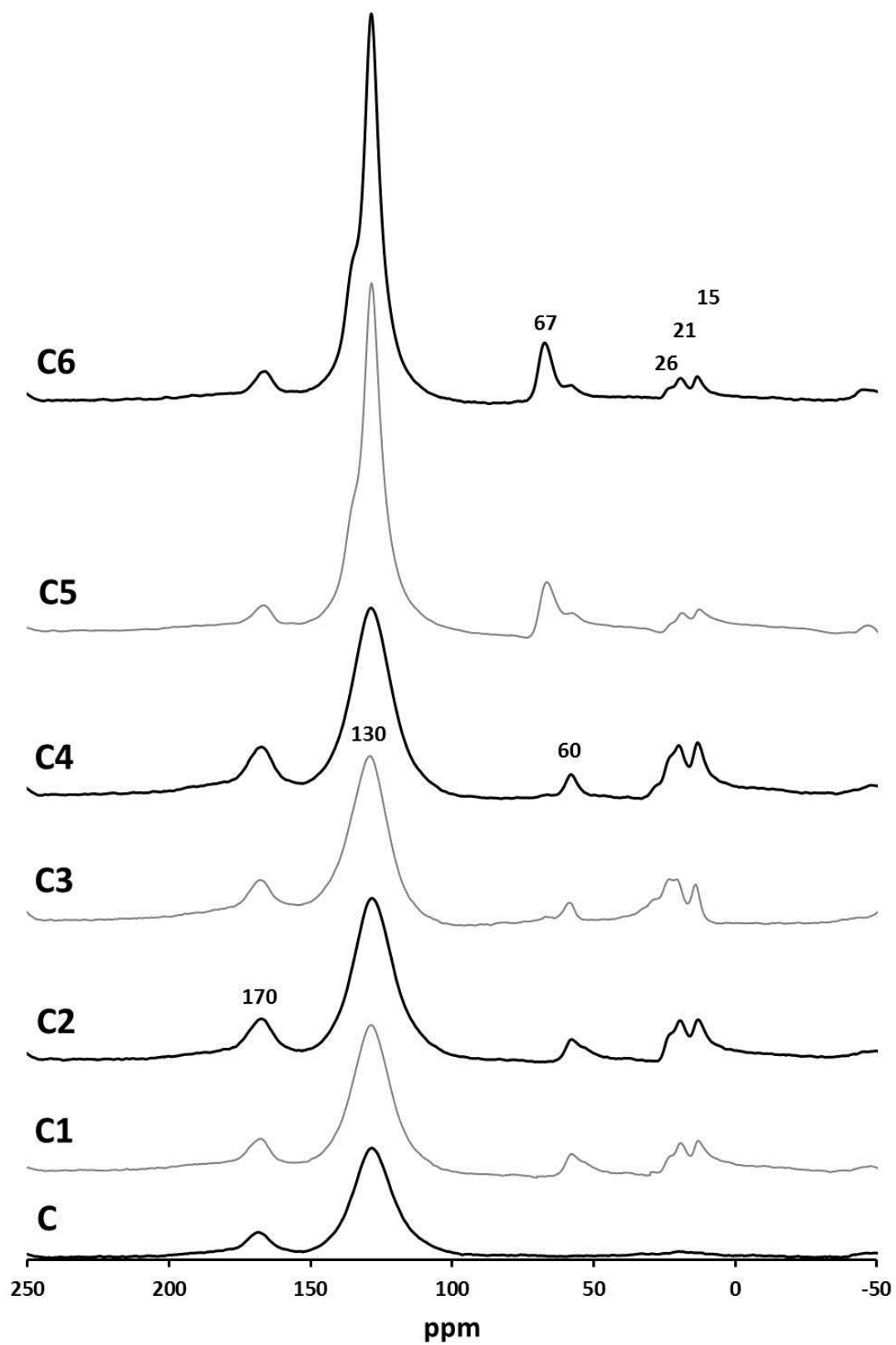


Figura 59. Espectros de CPMAS ¹³C NMR de los AH alquilados. C1-C2: Metilación (40 y 80%, respectivamente); C3-C4: Pentilación (40 y 80%, respectivamente); C5-C6: Bencilación (40 y 80%, respectivamente); C: AH sin modificación química

7.4.4.2.3 HPSEC

La cromatografía de exclusión de los derivados alquilados se muestra en la **Figura 60 (A, B y C)**. La incorporación de los grupos metilo, bencilo y pentilo aumentó el peso molecular de los AH como se muestra en los gráficos. El peso molecular se muestra en la **Tabla 23**. La alquilación con 60% con relación al contenido molar de protones ácidos en los AH mostró la adición de mayor masa. Este comportamiento podría explicarse por el hecho de que con esta concentración podría aumentar la reacción de grupos carboxilo e hidroxilo como consecuencia de la alteración de la disposición hidrófobo estereoquímica del material húmico.

Tabla 23. Peso molecular de los AH alquilados

AH sin modificación química	Peso molecular medio ponderado
	12292
Bz 40%	18152
Bz 60%	26480
Bz 80%	19142
Pe 40%	17323
Pe 60%	18332
Pe 80%	16780
Me 40%	18494
Me 60%	19639
Me 80%	17900

La modificación química puede favorecer un configuraciones estereoquímicas tal que pueden conducir a la formación de interacciones hidrofóbicas que son lo suficientemente fuertes como para obligar a las moléculas húmicas a permanecer juntas y causar su floculación en agregados de alto peso molecular aparente. Un enlace de hidrógeno es uno de los principales mecanismos de agregación como se observa por el hecho de que la metilación de los ácidos carboxílicos y grupos hidroxilo reduce los tamaños de los agregados de los AH en consecuencia se obtendrían agregados de menor peso molecular.

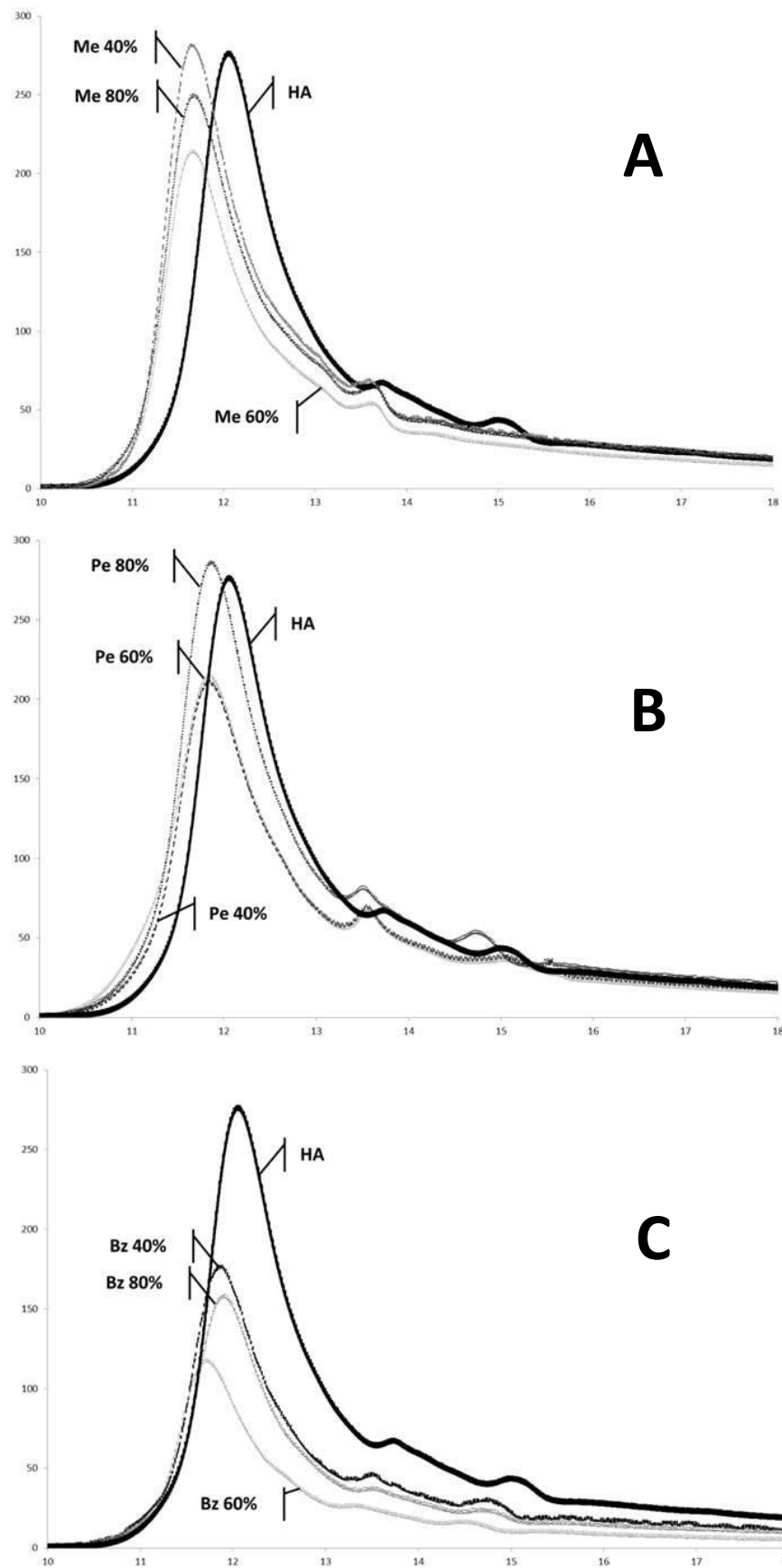


Figura 60. Espectros de HPSEC de los AH alquilados. A: Metilación; B: Pentilación; C: Bencilación

7.4.4.2.4 Análisis Elemental

La incorporación de agente alquilante debe observarse también en un incremento en el contenido de carbono e hidrógeno en el análisis elemental del producto obtenido, por lo tanto este análisis nos indicó que la reacción de alquilación se llevó a cabo con éxito, como se observa en la [Tabla 24](#). Un incremento en el contenido de nitrógeno indica que existen sales cuaternarias remanentes en el producto final. Inicialmente se adicionó 200 µl de una solución de HTBA al 40% v/v, es decir 80mg de HTBA; así, un incremento de 0.5% de nitrógeno de los ácidos húmicos sin modificar inicialmente a 0.86% del producto final modificado existe 0.16% más nitrógeno lo que representa 1.8mg residuales de HTBA adicionado inicialmente lo que representa un 97.75% de remoción de la sal. Por lo tanto el rango de remoción de HTBA osciló entre un 97.75% y un 99.4%.

Tabla 24. Condiciones de reacción 7, empleando HTBA

	NITRÓGENO	CARBON	HIDRÓGENO
ÁCIDO	0.5±0.02	42.25±1.26	2.05±0.09
B20	0.86±0.05	47.98±0.85	2.75±0.05
B50	0.75±0.04	51.39±1.79	3.09±0.06
B70	0.6±0.01	57.06±2.73	3.32±0.05
B100	0.63±0.04	63.4±3.64	3.76±0.13

7.4.4.2.5 Eficiencia de la reacción de alquilación

Con la finalidad de conocer la cantidad de milimoles de agente alquilante incorporados a los ácidos húmicos, se realizó un cálculo en base a los resultados obtenidos con los H⁺ RMN. Para ello se realizó una curva tipo de los haluros de alquilo adicionados, los resultados se muestra en la [Tabla 25](#). Tomando en cuenta que un 100% de agente alquilante adicionado a la reacción (considerando una reacción 1:1 con los AH) es igual al contenido de mmol de protón de los ácidos húmicos, este se considera como el 100% máximo de mmoles por adicionar en teoría. Como podemos observar la eficiencia de las reacciones fue muy baja ([Tabla 26](#)).

Este resultado puede ser consecuencia de la distribución de los grupos reactivos de los ácidos húmicos al momento de llevarse a cabo la reacción de alquilación, debemos tomar en cuenta que los ácidos húmicos son moléculas muy complejas cuya arreglo espacial se modifica de acuerdo al pH, temperatura, etc. Inicialmente se comenzaron todas las reacciones a un pH de 9, como se ha venido mencionando; sin embargo, al terminar todas las reacciones el pH fue muy bajo inclusive cercano a 1. La disminución en el pH era esperada si la reacción tenía lugar, debido a que existe una liberación de bromo o yodo (según sea el caso) el cual reacciona con el agua o los protones liberados en la reacción de sustitución y dan como producto el ácido correspondiente disminuyendo el pH de la reacción. Si consideramos que la estructura espacial de los AH es alterada por la presencia de ácidos y bases, es posible que solo una parte de los grupos carboxilo e hidroxilo reaccionen de una manera favorable en la reacción y por lo tanto la eficiencia de la reacción disminuye.

Tabla 25. Milimoles de agente alquilante incorporado a los ácidos húmicos (mM)

Porcentaje de alquilación	20%	50%	70%	100%
Bromuro de Bencilo	0.00964	0.01583	0.02	0.02775
Ioduro de Metilo	0	0.00344	0.0038	0.00424
Bromuro de Pentilo	0	0.0009	0.0095	0.00278
AH mmol H⁺ a reaccionar teórico	0.605	1.5125	2.1175	3.025

Tabla 26. Eficiencia de alquilación de los ácidos húmicos (%)

Porcentaje de alquilación	20%	50%	70%	100%
Bromuro de Bencilo	1.59	1.05	0.94	0.92
Ioduro de Metilo	0.00	0.23	0.18	0.14
Bromuro de Pentilo	0.00	0.06	0.45	0.09

7.4.4.2.6 Solubilidad de los productos

Todos los productos son solubles en agua pero dependiendo del grado de alquilación estos presentan menos solubilidad en agua a pH neutro, siendo necesaria la adición de una solución de hidróxido de sodio hasta pH 10 como máximo. Los productos presentan alta solubilidad en disolventes orgánicos como: acetona, diclorometano y metanol; aún en estado altamente protonado, indicando que se ha incrementado su hidrofobicidad y posiblemente sus características anfipáticas.

7.4.4.3 Evaluación de los AH modificados para el lavado del suelo contaminado artificialmente con HPA

La evaluación de la capacidad de eliminar los HPA (Phe, Ant, Flu y Pyr) en suelos con texturas diferentes por los derivados se muestran en las **Figuras 61, 62 y 63**. Como se puede apreciar el AH sin modificación química (AHn) tienen la capacidad de eliminar los cuatro HPA en diferente grado, pero el Flu se eliminó pobremente ($\approx 0.5\%$). La textura del suelo juega un papel importante en términos de la remoción de los HPA, debido a que una textura más fina, como el suelo B (franco-arcilloso) el cual se esperaba que fuera más difícil de lavar; este efecto se observó claramente. El lavado del suelo puede afectar la jerarquía estructural del suelo mediante la distribución del tamaño de partículas del agregado (**Kemper y Rosenau 1986**). La diferente eficiencia de extracción entre el suelo A y B pueden ser atribuidos a su diferente textura. La menor estabilidad del agregado conferida al suelo A (franco-areno-arcilloso) por su mayor contenido de fracciones de grueso tamaño, permitió una mejor extracción de HPA adsorbidos en la superficie exterior de las partículas gruesas. Inversamente, en el suelo B de textura fina, los contaminantes orgánicos se adsorben sobre las superficies de las partículas finas contenidas en los macro-agregados estructuralmente más estables. En general como se muestra en los gráficos de columnas, un porcentaje de alquilación de 60%, independientemente del agente de alquilación, resultó ser la mejor opción para la eliminación de los HPA en el estudio. Estos hallazgos pueden ser atribuidos a una variación en la agregación de las partículas del suelo después del tratamiento con agentes tensoactivos y por consiguiente una distribución diferente de los contaminantes en cualquiera de las superficies internas o externas de los nuevos agregados del suelo.

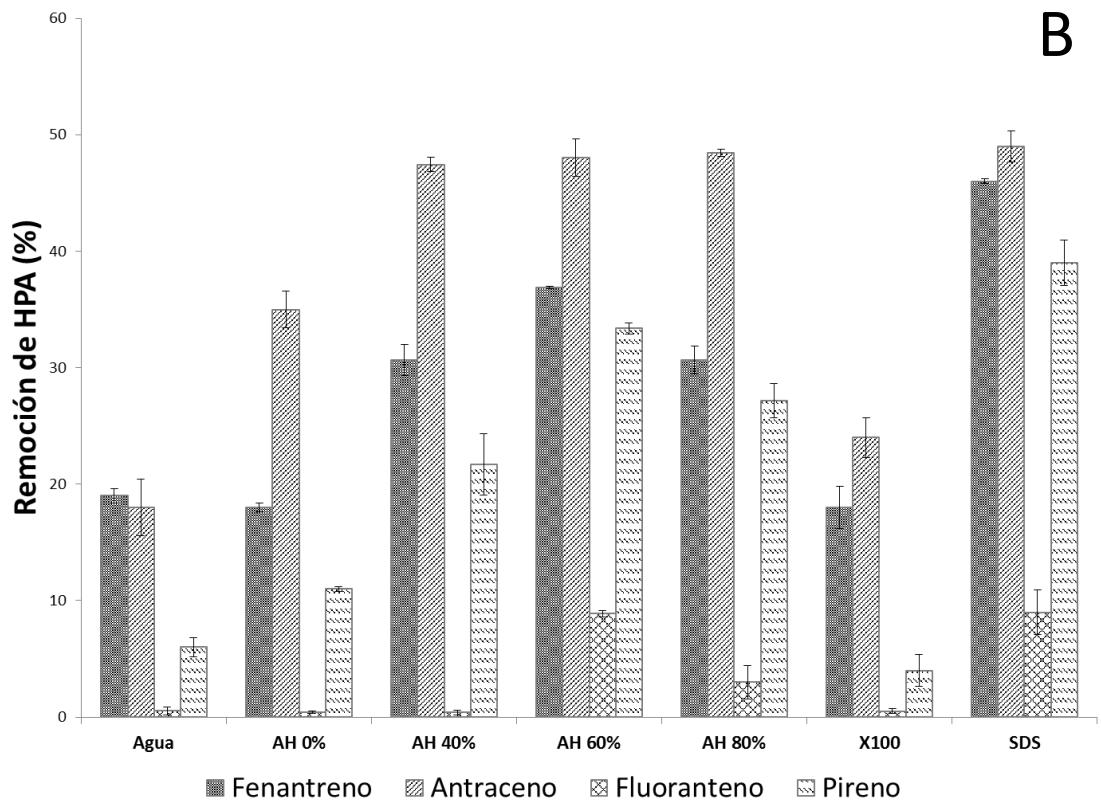
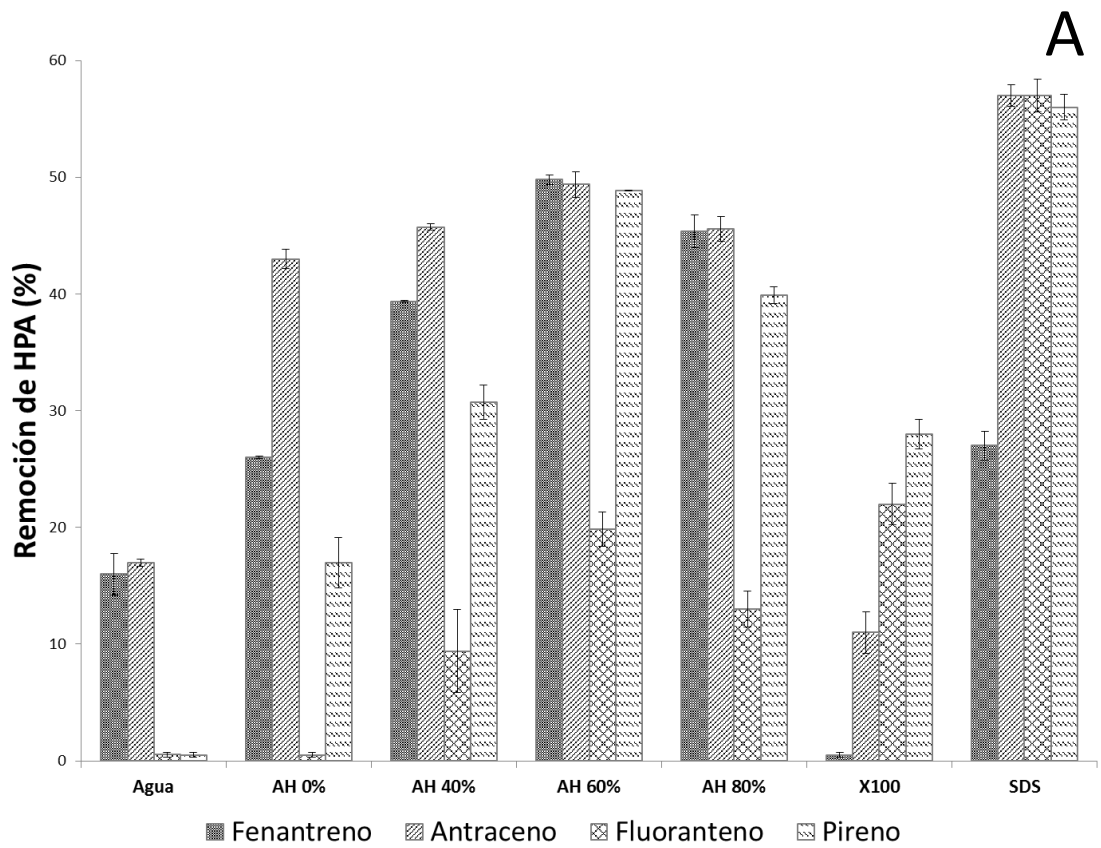


Figura 61. Remoción de HPAs por los derivados bencilalosos. A: Suelo franco-arena-arcilloso; B: franco-arcilloso

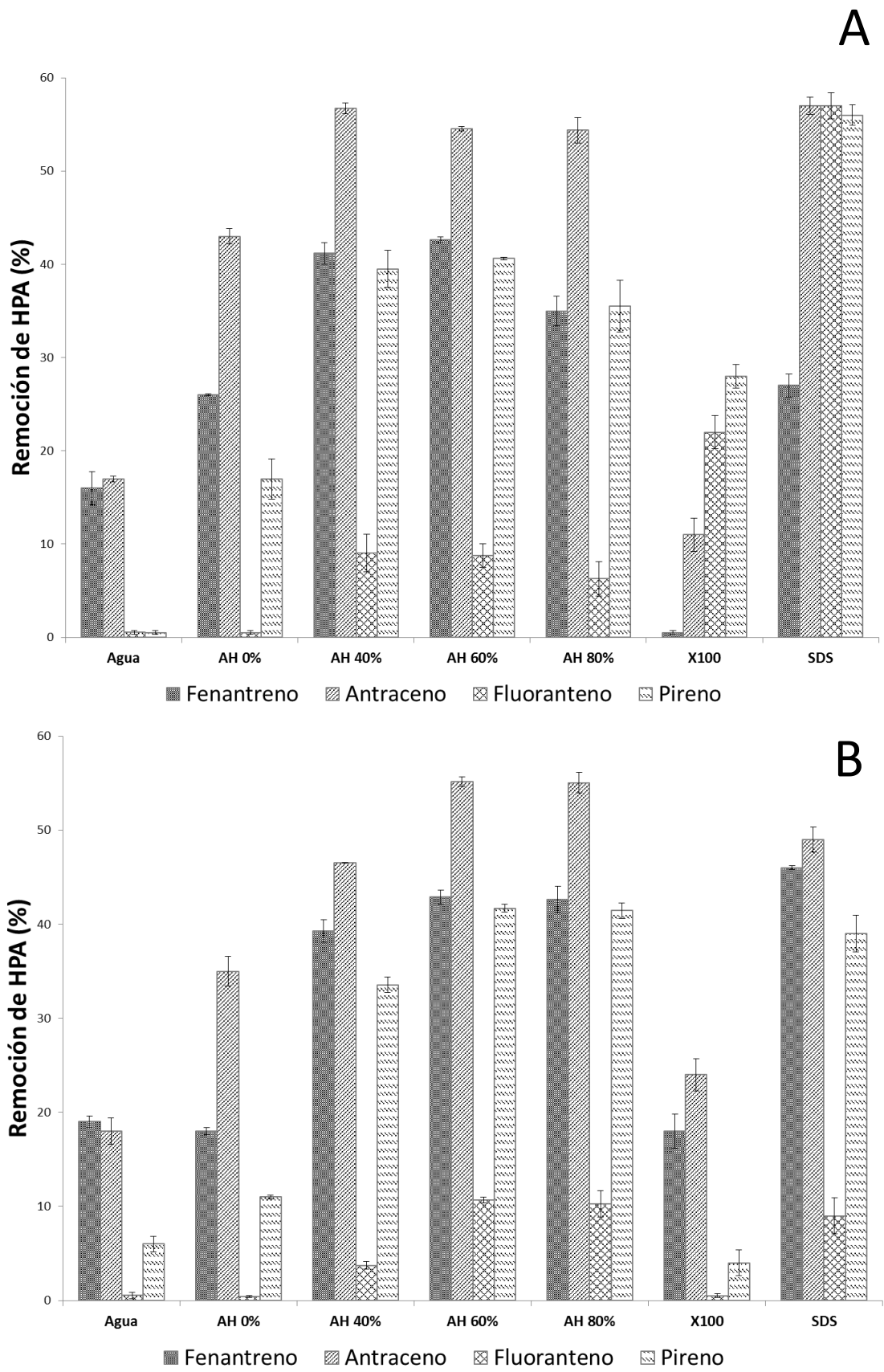


Figura 62. Remoción de HPAs por los derivados pentilados. A: Suelo franco-arena-arcilloso; B: franco-arcilloso

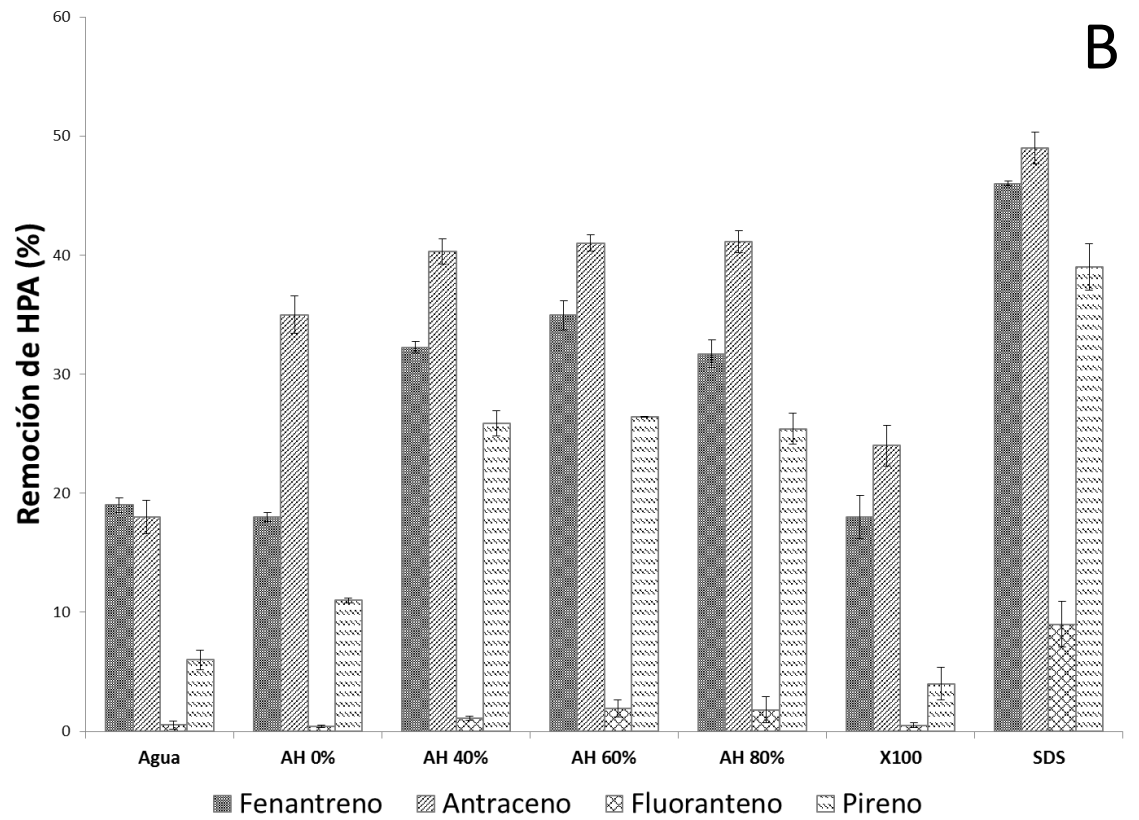
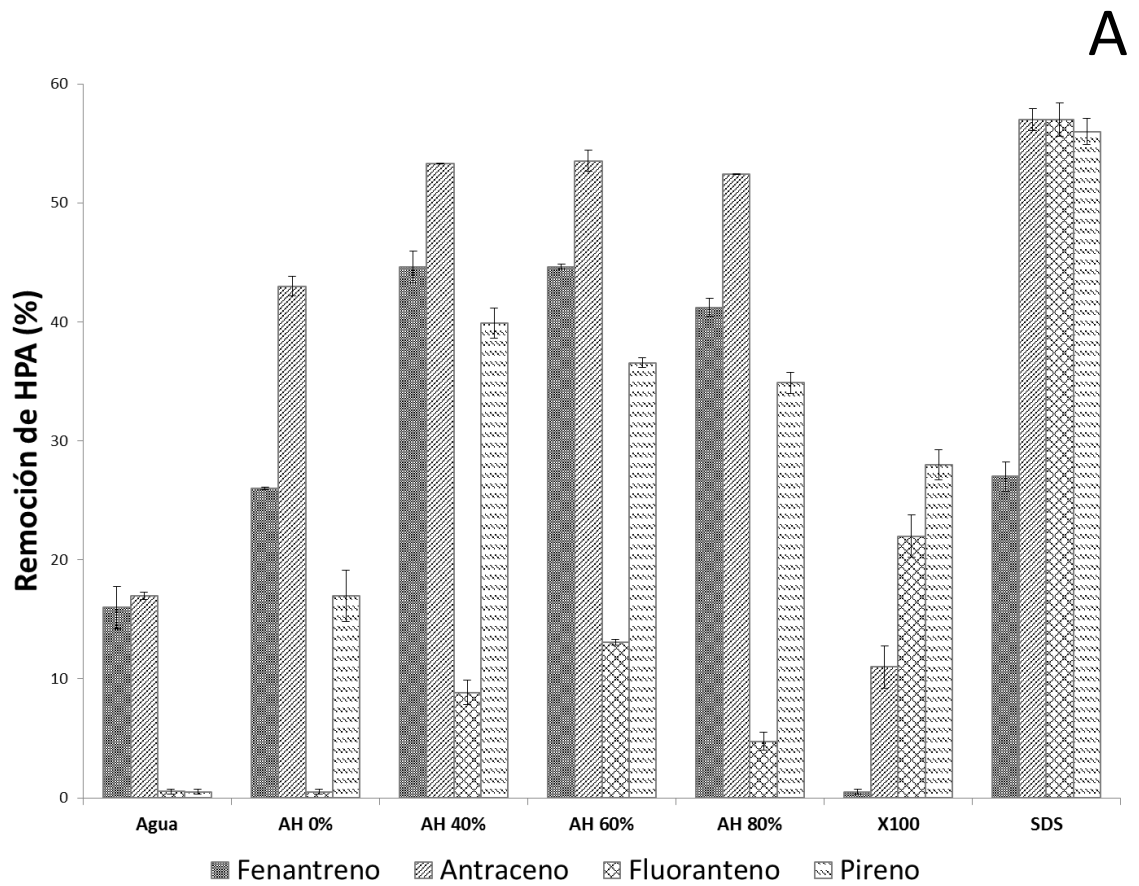


Figura 63. Remoción de HPAs por los derivados metilados. A: Suelo franco-areno-arcilloso; B: franco-arcilloso

Los derivados alquilados fueron evaluados a 40, 60 y 80% con relación al contenido molar de protones en los AH. Como se ve en la **Figuras (61 – 63)**, los **derivados bencilados** con un 60% de agente aquilante mostraron el máximo nivel de remoción para ambos suelos, cuyos valores promedio fueron: Phe, 50/37%; Ant, 49/48%; Flu, 20/9% y Pyr, 48/33%, respectivamente (**Figura 61**). Como se puede observar, el efecto de la textura afectó negativamente la remoción de los HPA cuando las partículas del suelo son más pequeñas. Los suelos con alto contenido de partículas de tamaño fino (limo y arcilla) reducen considerablemente la eficiencia de lavado de los tensoactivos (**Lee et al. 2002**). Es ampliamente aceptado que una textura fina en el suelo es un factor principal para la adsorción hidrófoba de la materia orgánica en la superficie de las partículas de suelo coloidales, lo que favorece las asociaciones de micro-agregados en macro-agregados (**Jastrow 1996**).

Aunque, la eliminación de los HPA (Phe, Ant, Flu y Pyr) aumentó con respecto a los AH sin modificar, en 0.9/0.1/20/2 veces para el suelo A y unas 1/0.3/8/2 veces para suelo B, respectivamente. Estos resultados muestran que la remoción de los HPA se logró con la modificación química. La razón por la cual el 60% de la alquilación de los AH fue la mejor, puede ser debido a que se alcanzó un equilibrio químico estructural en el que el máximo de los grupos funcionales del agente alquilante, reaccionaron de tal modo que la inclusión de grupos bencilo permitieron incrementar la interacción con los HPA a través de enlaces $\pi - \pi$ con los anillos aromáticos incorporados.

Los derivados con **grupo pentilo** (**Figura 62**) mostraron un nivel máximo de remoción de HPA para los suelos A y B con un 60% de alquilación cuyos valores fueron alrededor de: Phe, 43/35%; Ant, 54/41%; Flu, 13/2% y Pyr, 37/26%. Una vez más el efecto de textura afectó negativamente la remoción; sin embargo, aumentó el nivel de eliminación de los HPA en comparación con HA sin modificar en 0.7/0.25/13/2 veces para el suelo A y 0.9/0.1/3/1.2 veces para el suelo B. En este sistema no fue tan claro que porcentaje de alquilación fue el mejor en la remoción, pero hay una ligera tendencia hacia el 60% de nuevo. En este caso en particular, el incremento en la remoción individual de los HPA para los diferentes porcentajes de alquilación fue poco perceptible, sólo cambios significativos en la remoción de Flu se observaron. La incorporación de grupos pentilo permitió incrementar la interacción con HPA probablemente como resultado de fuerzas débiles tales como Van der Waals o $\pi - CH$.

Finalmente las remociones de los derivados alquilados con **grupo metilo** se observan en la [Figura 63](#).

Un análisis de la varianza (ANOVA) fue aplicado a los resultados obtenidos. Los tres factores que intervienen en la remoción de los HPA fueron tomados en cuenta; es decir, A: textura del suelo; B: grupos funcionales incorporados y C: grado de sustitución de las sustancias húmicas de acuerdo con su porcentaje de acidez. El ANOVA mostró que una de las principales interacciones fue entre las variables B • C cuyos datos se representaron gráficamente en la [Figura 64](#). Todos los factores que intervienen en el modelo fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$), así como las interacciones A • B y A • C. La representación gráfica muestra el efecto pobre de los derivados pentilados. A veces, el grado de sustitución más alto no es un factor importante en la remoción de los HPA o no tiene una correlación. Así que hay que tener en cuenta varias consideraciones para interpretar los resultados.

Los tensoactivos sintéticos son reportados en la eliminación de los contaminantes orgánicos de suelos por un mecanismo que implica la repartición de contaminantes en las fases micelares formadas surfactante en agua ([Chun et al. 2002](#), [Cuypers et al. 2002](#)). Las lavados de suelo realizados en este trabajo por cualquiera de los tensoactivos sintéticos (SDS y TX100), naturales (AH) o modificados fueron más eficientes que el agua en la eliminación de cantidades significativas de hidrocarburos policíclicos aromáticos ([Figura 64](#)).

El máximo nivel de remoción de los suelos A y B se llevó a cabo por los derivados al 60% cuyos valores fueron alrededor de: Phe, 43/43%; Ant, 55/55%; Flu, 9/11% y Pyr, 41/42%. El efecto de la textura no afectó significativamente los niveles de remoción con este derivado alquilado entre los suelos trabajados observándose incrementos de remoción de un 0.5/0.25/20/2 veces para suelo A y de 1.2/0.55/9/2.5 veces para el suelo B ([Figura 65](#)). Este sistema fue un poco más claro en definir que un 60% de alquilación fue el más efectivo en la remoción de HPA. Los derivados metilados son menos afectados en cambios de textura del suelo, siendo más versátiles en su aplicación en suelos con diferentes texturas. Se sugiere que por ser los grupos metilo muy pequeños podrían tener más interacción con los HPA evitando dar rigidez a la estructura supramolecular de los ácidos húmicos por lo que su flexibilidad no se vería comprometida permitiendo que interactúen más fácilmente con estructuras cuya forma sea diversa.

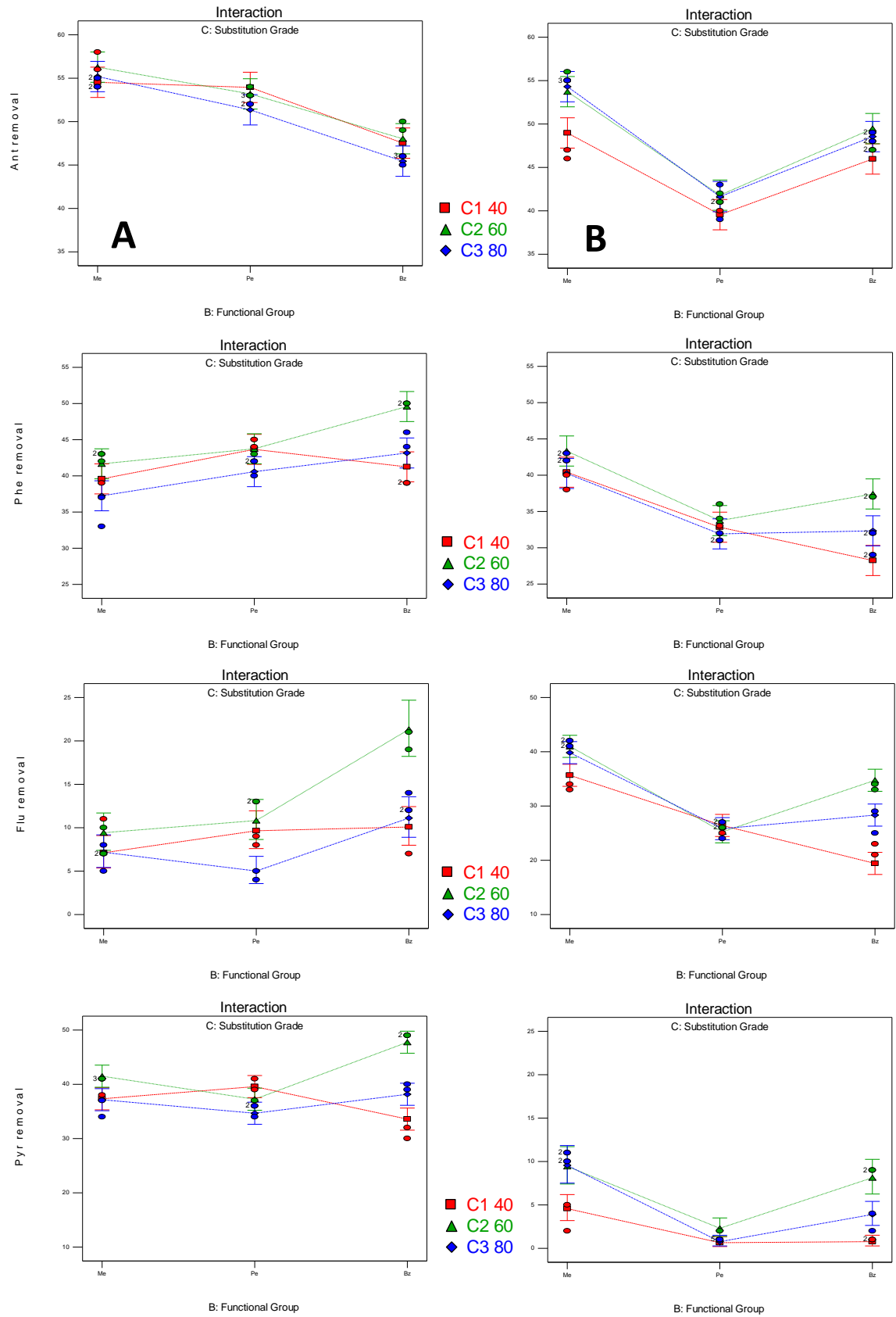


Figura 64. Efecto de las interacciones entre las variables involucradas en la remoción de HPA. Textura del suelo: A o B.

De acuerdo con los resultados, la alquilación 60% fue la más eficiente para remover los HPA de cada reacción; así, se compararon la remoción de estos con respecto a los agentes tensoactivos comerciales que se utilizan en la restauración de los suelos contaminados, tales como el SDS y Triton X100 (**Figura 65**). Como se muestra en los gráficos de barras, la eficiencia de remoción de HPA en el estudio es similar a los obtenidos por los agentes tensoactivos comerciales; sin embargo, es posible observar que en las condiciones de trabajo y el tipo de suelo utilizado, el tensoactivo Triton X100 fue el más pobre en la remoción. Esto puede atribuirse a la heterogeneidad de la fase micelar de los AH modificados y por lo tanto, su capacidad para incorporar con igual eficiencia HPA de diferentes estructuras (**Fava y Piccolo 2002**). El tensoactivo Triton X100 sólo fue efectivo en la remoción de la Flu en el suelo A, pero no en el caso del suelo B. En general, los tensoactivos sintéticos utilizados aquí fueron capaces de reducir el contenido de contaminantes de los dos suelos de un 10 hasta un 60%. Sin embargo, los tensoactivos sintéticos, que son eficientes en los lavados del suelo pueden convertirse en un problema ambiental adicional debido a su toxicidad biológica.

La molécula de fluoranteno parece ser la más difícil de eliminar por todos los tensoactivos comerciales y derivados húmicos, posiblemente como consecuencia de su estructura química, ya que, no sólo anillos aromáticos tienen su estructura sino que además posee un anillo no bencénico, lo cual podría haber afectado a la interacción con los grupos funcionales de los derivados húmicos. El derivado bencilo fue el más cercano a los niveles de remoción obtenidos por el SDS en el suelo A, pero no en el suelo B. **Perminova (1999)** señaló que los materiales húmicos naturales (sin modificación química previa) ricos en compuestos aromáticos son los agentes de desintoxicación más eficientes en contra de los HPA al interactuar con estos, como la estructura obtenida en este trabajo. Las moléculas húmicas contienen muchos anillos aromáticos con grupos carboxílico (-COOH) y fenólico (-OH), azúcares y péptidos (**Tan 2003**). Ya que las moléculas de los HPA se asemejan a las sustancias húmicas, algunas moléculas se unen a la porción aromática y otras a la fracción hidrófoba (**Kile y Chiou 1989, Chiou et al. 1998**). Sin embargo, el derivado más eficaz para eliminar los HPA en el suelo B fue el derivado metilado.

La capacidad predominantemente de los componentes alifáticos de los materiales húmicos a sorber compuestos hidrófobos se ha demostrado previamente con pireno (**Chefetz et al. 2000**). **Hu et al. (2000)** informaron de que estas estructuras alifáticas; que son un componente recalcitrante

de la materia orgánica, tienen unas características químicas específicas (amorfas y cristalinas) que pueden explicar la alta afinidad de los HPA como el fenantreno para estos componentes alifáticos.

Recientemente, [Simpson et al. \(2003\)](#) hicieron observaciones con AH sometidos a un proceso de blanqueado y que contradice la noción popular de que sólo las estructuras aromáticas contribuyen a la absorción compuesto hidrófobo. Componentes orgánicos alifáticos y conformación física de la materia orgánica merecen más atención en los estudios de sorción, ya que parece que juegan papeles importantes en la sorción y la persistencia de los contaminantes en el medio ambiente. Es importante destacar que la unión de un compuesto a los HPA especialmente por las sustancias húmicas no sólo depende de la hidrofobicidad del soluto, pero también del tamaño de la molécula de soluto y su capacidad para encajar en las cavidades hidrófobas de las sustancias húmicas o alterar la disposición hidrófobo estereoquímica del material húmico que también podría exponer a la solubilización de los contaminantes adsorbidos en las superficies de las partículas finas. Algunos AH (por ejemplo, los derivados de lignito) tienen un esqueleto aromático condensado, lo que hace que las cadenas de polímero sean relativamente rígidas. Por el contrario, algunos AH del suelo contienen extensas conexiones de alquilo que conducen a una estructura más flexibles.

Se ha encontrado que los polímeros largos; que son más flexibles, son considerablemente mejores agentes para el secuestro de carbono de pequeñas moléculas orgánicas, que los cortos y rígidos. Posiblemente debido al aumento de sus propiedades coloidales, el grado de polimerización y la incorporación de una variedad de grupos funcionales con diferentes reactividades dieron estos resultados. En general se puede observar claramente que los niveles de remoción fueron similares a los obtenidos por los agentes tensoactivos comerciales SDS y Tritón X-100, lo que da un buen potencial para la aplicación de esta tecnología y los beneficios que aporta a la incorporación de suelo contaminado el material húmico además los productos aún son soluble en agua y ahora en algunos disolventes orgánicos tales como diclorometano y hexano. La ventaja de la aplicación de sustancias húmicas como agentes detoxificantes para los fines de remediación, es la ausencia de peligro en la contaminación secundaria de los sitios contaminados. Otra ventaja es una acción combinatoria de los sustancias húmicas; es decir, no sólo exponen un impacto desintoxicante sobre los contaminantes hidrófobos, si no que también pueden imponer un efecto beneficioso directo sobre la comunidad biótica en el sitio contaminado.

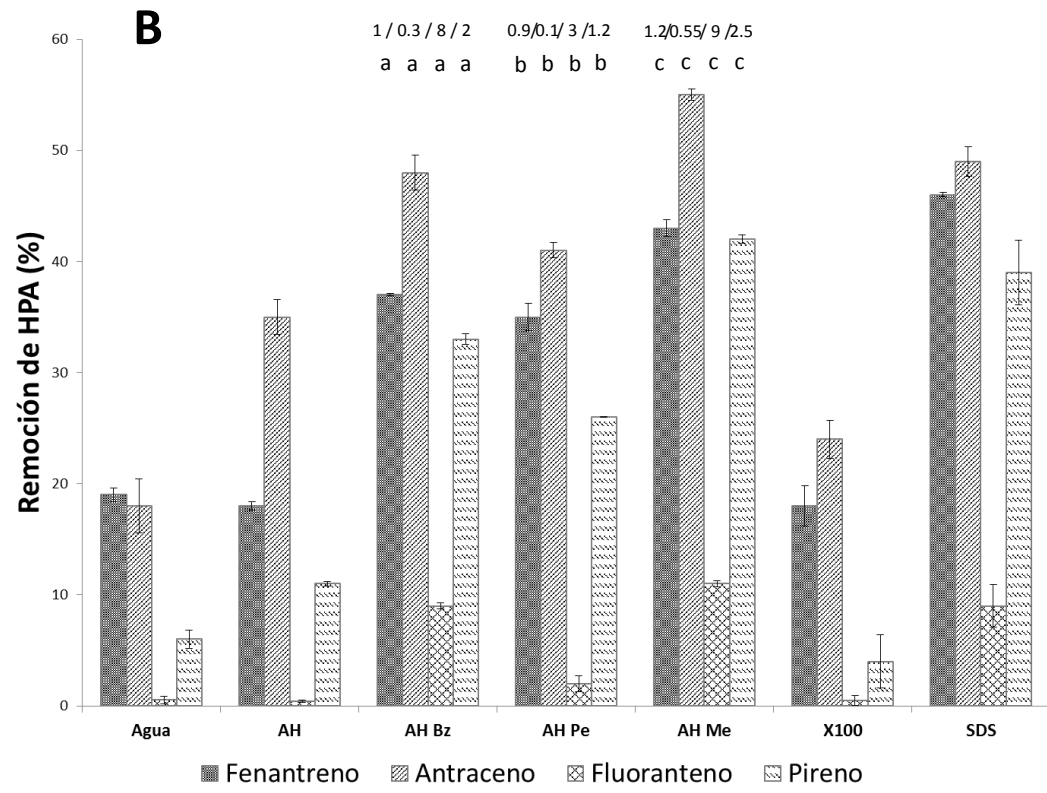
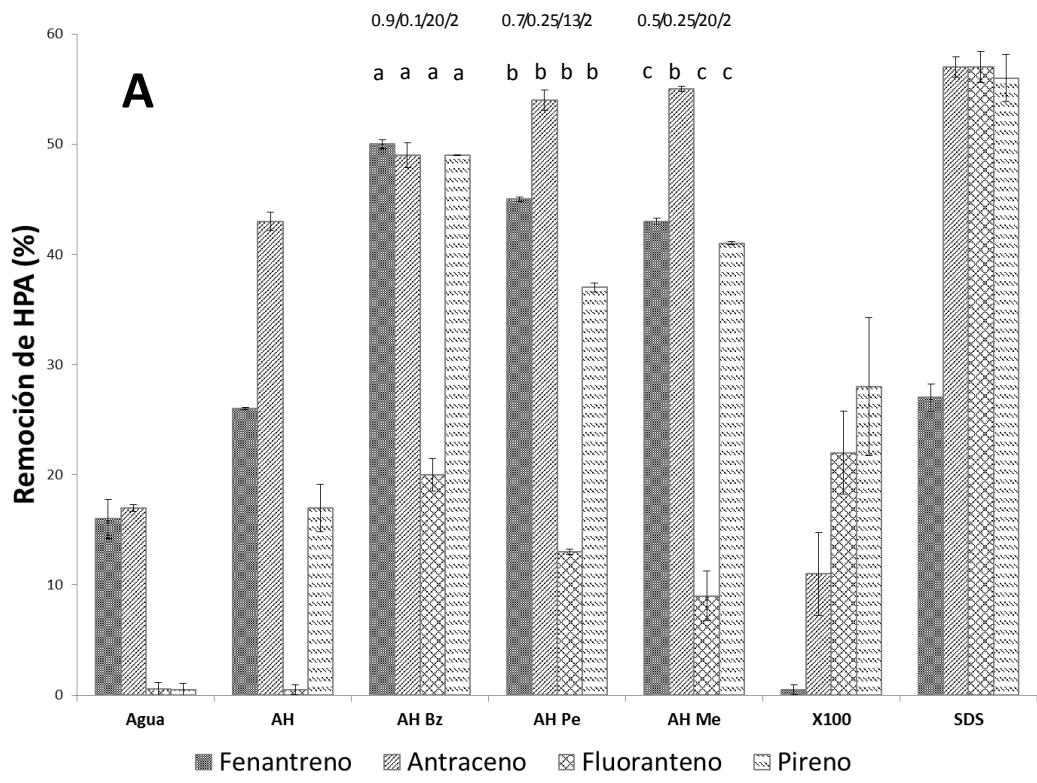


Figura 65. Comparaciones de eliminación de HPA entre los derivados de los AH y tensoactivos comerciales.

Mismas letras indican que no hay diferencia estadística. Los números por encima de las columnas muestra el número de veces que aumenta la eliminación de HPA con respecto a AH sin modificar.

Los AH ayudan a disminuir los suelos compactos al neutralizar las cargas y evitar su aglomeración, ayudan en la transferencia de micronutrientes del suelo a la planta, mejoran la retención de agua, aumentan la tasa de germinación de semillas y estimulan el desarrollo de la microbiota en los suelos (Senesi et al. 1991), por si fuera poco, su proceso de purificación es más barata que la síntesis de cualquier otro absorbentes y, por otra parte, debido a su alta operabilidad, que absorben más de los absorbentes usados hasta la fecha, tales como carbones activos o arcillas. Este trabajo también indica por primera vez que los ácidos húmicos modificados remueven cantidades similares o mayores de HPA en suelos contaminados artificialmente con hidrocarburos tan bien con los tensioactivos sintéticos.

8 CONCLUSIONES

Se demuestra que los materiales orgánicos estructuralmente complejos y ricos en moléculas aromáticas como la VC, BC y EL; así como, el tejido somático de lombriz poseen microbiotas capaces de usar como fuente de carbono los HTP e HPA.

Se aislaron 174 microorganismos hidrocarbonoclastas; sin embargo, finalmente se pudieron conservar solo 140 de los cuales 100 fueron bacterias y 40 hongos filamentosos, con morfología colonial y microscópica diferentes.

El material orgánico que presenta mayor contenido de microorganismos hidrocarbonoclastas (cepas con morfología colonial y microscópica diferentes) fue la VC con 45, seguido de el BC con 40 después la L con 31 y finalmente el EL con 24.

Se evaluó la capacidad de remoción de HPA mediante los diversos inóculos (MT, MTB o CM's), observándose que la remoción de HPA en los sistemas experimentales binarios fue mayor.

El CM constituido por EL + BC removió mas HPA que cualquier otro sistema.

El inóculo constituido por EL + BC estuvo compuesto por 44 cepas, las cuales fueron clasificadas en 15 géneros (*Dietzia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Arthobacter*, *Brevibacterium*, *Ensifer*, *Rhizobium*, *Naxibacter*, *Delftia*, *Stenotrophomonas* y *Bacillus*) dentro de los siguientes Filum: 9, Actinobacteria; 5, Proteobacteria y 1 Firmicutes.

El CM seleccionado (EL + BC) remueve más eficiente HTP que el CMC, dependiendo de la concentración inicial de combustóleo y tipo de SH adicionada.

Se mejoraron las propiedades tensodepresoras de las SH, estableciendo dos estrategias de modificación química, incorporando cadenas largas alifáticas o grupos alquilo pequeños (metil, pentil y bencil).

Ambos métodos condujeron a la obtención de derivados cuyas propiedades tensoactivas fueron mejoradas, alrededor de un 20% en la eficiencia de desorción de HTP y de 9 hasta 20 veces más para los HPA, con respecto a los análogos no modificados.

Por primera vez los AF sin modificar fueron evaluados como agente tensoactivos para el lavado de suelo contaminado, mostrando un mejor rendimiento que los AH.

Derivado de la primera reacción propuesta; la modificación química de las SH y por primera vez, bajo irradiaciones de microondas, se incrementó la capacidad de remover HTP de suelo contaminado, siendo el producto obtenido por alquilación de AH con cadena C12 y alquilación de AF con cadena C10, los productos con el mejor rendimiento.

La eliminación de los HPA de un suelo franco-arenoso-arcilloso, se incrementó de una a 20 veces mediante la incorporación de grupos bencilo, mientras que la eliminación de los HPA de un suelo franco arcilloso, se incrementó de una a nueve veces mediante la incorporación de grupos bencilo ambas reacciones llevadas a cabo en AH.

Los resultados indican que la textura del suelo es un parámetro importante a tener en cuenta para seleccionar el AH modificado más adecuado para extraer los contaminantes del suelo.

Se ha demostrado que la modificación química de un tensoactivo natural como las SH, se puede utilizar en el lavado de un suelo contaminado con la misma eficacia que la de agentes tensoactivos sintéticos o incluso mejor.

9 Recomendaciones

Dado que el ensayo para determinar la tolerancia a la presencia HPA de las cepas aisladas por el sistema BC + EL, indicó que aproximadamente el 91% fueron capaces de crecer en presencia de estos, es por tanto importante analizar el potencial individual de las cepas aisladas con la finalidad de seleccionar aquellas que puedan no solo tolerar la presencia de HPA sino que también sean capaces de usarlos como única fuente de carbono.

Los sistemas en con la microbiota total presentaron una disminución de la tensión superficial de hasta un 54% respecto a los blancos (medio mineral con/sin EL); presumiblemente por efecto de actividad tensodepresiva de los biosurfactantes generados. Este hallazgo es importante debido a que alguna o algunas bacterias poseen el potencial de generar biosurfactantes, lo cual puede tener un potencial en lavado de suelo o para incrementar la biodisponibilidad de los hidrocarburos.

Como consecuencia de la presencia de queroseno la remoción de HPA se ve favorecida entre un 20% hasta un 30% mas que en ausencia de éste. La importancia de este fenómeno radica en que los microorganismos aislados posiblemente requieren de una inducción enzimática o emplear cometabolismo para metabolizar los hidrocarburos.

Se demuestra que es posible usar indiferentemente cualquier SH (AH o AF) para mejorar el proceso de remoción de HTP. Con propósitos de remediación futuros en donde se empleen las SH y con la finalidad de abatir costos de tratamiento se sugiere emplear ácidos húmicos por ser estos más económicos.

10 BIBLIOGRAFIA

- Abiola A., Olenyk, M. (1997). Effects of amendment surfactants on bioremediation of hydrocarbon contaminated soil by composting. 34th. Annual Soil Science Workshop.
- Abraham WR, Nogales B, Golyshin PN, Pieper DH, Timmis KN (2002) Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities and sediments. *Curr Opin Microbiol* 5: 246–53.
- Abrahams PW (2002). Soils: their implications to human health. *Sci Total Environ*, 291:1–32.
- Acharya, P. and Ives, P. (1994). Incineration at bayou bounfouca remediation project. *Waste Manage.*, 14, 13-26.
- Adebusoye SA, Ilori MO, Amund OO, Teniola OD, Olatope SO, (2007) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons in a polluted tropical stream. *World J Microb Biot* 23: 1149–1159.
- Akkermans, A. D. L., Van Elsas J. D., and De Bruijn F. J.. (1996). *Molecular microbial ecology manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Alef K, Nannipieri PP (1995) *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press: San Diego, California, US.
- Alexander, M. (1999). *Biodegradation and bioremediation*. Academic Press, San Diego. 302.
- Almendros G (1995) Sorptive interactions of pesticides in soils treated with modified humic acids. *Eur J Soil Sci* 46:287–301.
- Atlas, R.M., Cerniglia, C.E., (1995) Bioremediation of petroleum pollutants: diversity and environmental aspects of hydrocarbon biodegradation. *Biosci* 45: 332–338.
- Balmer, M. E., Goss, K. U., and Schwarzenbach, R. P. (2000). Photolytic transformation of organic pollutants on soil surfaces-An experimental approach. *Environ. Sci. Technol.*, 34, 1240-1245.
- Bamforth S. and Singleton L (2005). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 80, 723-736.

- Barak, P. and Chen, Y. (1992). Equivalent radii of humic macromolecules from acid-base titration. *Soil Science*, 154, 184- 195.
- Barbieri P, Palladino L, Di Gennaro P, Gatli E (1993). Alternative pathways for o-xylene or m-xylene and p-xylene degradation in a *Pseudomonas stutzeri* strain. *Biodegradation* 4:71-80.
- Beckles, D.M., Ward, C.H. and Hughes, J.B. (1998) Effect of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons and sediments on fluoranthene biodegradation patterns. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1246-1251.
- Berselli S, Milone G, Canepa P, Di Gioia D, and F. Fava. (2004). Effects of cyclodextrins, humic substances, and rhamnolipids on the washing of a historically contaminated soil and on the aerobic bioremediation of the resulting effluents. *Biotechnol Bioeng.* Oct 5; 88(1):111-20.
- Bhandari A, Surampalli RY, Champagne P, Ong SK (2007) (Eds) *Remediation Technologies for Soils and Groundwater*. ASCE, Virginia.
- Bogan BW, WR Sullivan (2003) Physicochemical soil parameters affecting sequestration and mycobacterial biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Chemosphere.* 52:1717-26.
- Bogdal D, Loupy A (2008) Application of microwave irradiation to phase-transfer catalyzed reactions. *Org Proc Res Dev* 12:710–722.
- Boldrin B, Tiehm A, Fritzsche C (1993) Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a *Mycobacterium* sp. *Appl Environ Microbiol* 59:1927-1930.
- Boonchan, A., Britz, M.L., Standley, G.A. (2000) Degradation and mineralization of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial co-cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1007-1019.
- Boopathy R (2000) Factors limiting bioremediation technologies. *Biores. Technol.* 74: 63–7.
- Bosma, T.N.P., Middeldorp, P.J.M., Schraa, G. and Zehnder, A.J.B., 1997. Mass Transfer Limitation of Biotransformation: Quantifying Bioavailability. *Environmental Science & Technology*, 31(1): 248-252.
- Bossert, I.D., Bartha, R., (1986) Structure–biodegradability relationships of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Bull Environ Contam Toxicol* 37: 490–495.

Bouchez M., Blanchet D., Vandecasteele J.P. (1995). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Appl Microbiol Biotechnol*, 43:156-164.

Braddock, J. F., Ruth, M. L., Catterall, P. H., Walworth, J. L. and McCarthy, K. A. (1997) Enhancement and inhibition of microbial activity in hydrocarbon-contaminated Arctic soils: implications for nutrient amended bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2078-2084.

Burgos WD, Pisutpaisal N, Tuntoolavest M, Chorover J, Unz RF (2000) Biodegradation of 1-naphthol in the presence of humic acid. *Environ. Eng. Sci.* 17, 343–351.

Campanella J., L. Bitincka, J. Smalley. (2003). MatGAT: an application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. *BMC Bioinform.* 4:9.

Casellas, M.; Fernández, P.; Bayona, J.M. and Solanas, A.M. (1995), "Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in urban airborne particulate matter from Barcelona (Spain)", *Chemosphere* 30: 725–740.

Carberry JB, Wik J (2001) Comparison of ex situ and in situ bioremediation of unsaturated soils contaminated petroleum. *J Environ Sci Health A* 36: 1491–503.

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, 1-13.

CEM; <http://www.cem.com>

Cerniglia, C.E. (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3, 351-368.

Chai X, Takayuki S, Cao X, Guo Q, Zhao Y (2007) Spectroscopic studies of the progress of humification processes in humic substances extracted from refuse in a landfill. *Chemosphere* 69:1446–53.

Chaillan F, Le Flèche A, Bury E, Phantavong YH, Grimont P, Saliot A, Oudot J (2004) Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Res Microbiol* 155: 587–595.

- Chaîneau, C.H., Morel, J.L. and Oudot, J., 1995. Microbial degradation in soil microcosms of fuel oil hydrocarbons from drilling cuttings. *Environ. Sci. Technol.* 29, 1615-1621.
- Chaîneau, C.H., G. Rougeux, C. Yepremian and J. Oudot, 2005. Effect of nutrient concentration on biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil. *Soil Biol. Biochem.*, 37: 1490-1499.
- Chefetz, B., A.P. Deshmukh, P.G. Hatcher, and E.A. Guthrie. 2000. Pyrene sorption by natural organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 34:2925–2930
- Cheng KY, Wong JWC (2006) Combined effect of nonionic surfactant Tween 80 and DOM on the behaviors of PAHs in soil–water system. *Chemosphere* 62:1907–1916.
- Chilom G, Bruns AS, Rice JA (2009) Aggregation of humic acid in solution: contributions of different fractions. *Organic Geochem* 40:455–60.
- Cho HH, Choi J, Goltz MN, Park JW (2002) Combined effect of natural organic matter and surfactants on the apparent solubility of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Environ Qual* 31:275–80.
- Chu W, Chan KH (2003) The mechanism of the surfactant-aided soil washing system for hydrophobic and partial hydrophobic organics. *Sci Tot Environ* 307:83–92.
- Chu W, So WS (2001) Modeling the two stages of surfactant-aided soil washing. *Water Res* 35:761–767.
- Chu, W., Chan, K.H., (2003). The mechanism of the surfactant-aided soil washing system for hydrophobic and partial hydrophobic organics. *Sci. Tot. Environ*, 307, 83-92.
- Chun, C.L., Lee, J.-J., Park, J.-W.,(2002). Solubilization of PAH mixtures by three different anionic surfactants. *Environ. Poll.* 118, 307-313.
- Civilini, M., 1994. Fate of creosote compounds during composting. *Microbiology in Europeo* 2, 16)24.
- Clark, R. C. and Brown, D. W (1977) Petroleum: properties and analysis in biotic and abiotic systems. In Malins (Ed) *Effects of Petroleum on Arctic and Subarctic Environments and Organisms* Vol. 1. Nature and Fate of Petroleum. Academic Press, Inc., New York, pp-1-89.

Cole J.R., B. Chai, R.J. Farris, Q. Wang, S.A. Kulam, D.M. McGarrell, A.M. Bandela, E. Cardenas, G.M. Garrity, and J.M. Tiedje. (2007). The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic. Acid. Res.* 35:D169-D172.

Coleman, W. E., Munch J. W., Streicher R. E., Ringhand H. P., and Kopfler F. C. (1984) The identification and measurement of components in gasoline, kerosene, and No. 2 Fuel Oil that partition into the aqueous phase after mixing. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 13: 171-178.

Conte P., Zena A., Pilidis G., Piccolo A. (2001) Increased retention of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils induced by soil treatment with humic substances. *Environmental Pollution* 112: 27-31.

Conte P., Agretto A., Spaccini R., Piccolo A., (2005). Soil remediation: humic acids as natural surfactants in the washings of highly contaminated soils, *Environm. Pollution*, 135, 515-522.

Criddle, C.S. (1993) The kinetics of cometabolism. *Biotech. Bioeng.* 41, 1048-1056.

Crown Ether Crosslinked Chitosan as a Chelating Agent for Heavy Metal Ions (M(+n)). *Molecules*, 15, 6757-6268.

Curtis, T.P., W.T. Sloan, and J. W. Scannell (2002). Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:10494-10499.

Cuyper, C., Pancras, T., Grotenhuis, T., Rulkens, W. (2002). The estimation of PAH bioavailability in contaminated sediments using hydroxypropyl- β -cyclodextrin and Triton X-100 extraction techniques. *Chemosphere* 46, 1235–1245

Das N and Chandran P (2011) Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnol Res Int*, doi: 10.4061/2011/941810. Epub 2010 Sep 13.

Daugulis AJ and McCracken CM (2003) Microbial degradation of high and low molecular weight polyaromatic hydrocarbons in a two-phase partitioning bioreactor by two strains of *Sphingomonas* sp. *Biotechnol Lett* 25: 1441–1444.

Dean-Ross D.; Moody J., Cerniglia C.E. (2002). Utilization of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from contaminated sediment. *FEMS Microbiology Ecology* 41: 1-7.

- Dejonghe, W., Boon, N., Seghers, D., Top, E.M., Verstraete, W. (2001). Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: missing links. *Environmental Microbiology* 3, 649–657.
- Deshpande, S., Shiau, B.J., Wade, D., Sabatini, D.A., Harwell, J.H., (1999). Surfactant selection for enhancing ex situ soil washing. *Wat. Res.*, 33, 351-360.
- Di Toro, S., Zanaroli, G., Fava, F. (2006). Intensification of the aerobic bioremediation of an actual site soil historically contaminated by polychlorinated biphenyls (PCBs) through bioaugmentation with a non-acclimated, complex source of microorganisms. *Microbial Cell Factories* 5, 11–19.
- Diaz E. (2004) Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *Int Microbiol* 7: 173–80.
- Dibble, J. T. and R. Bartha (1979): The effect of environmental parameters on the biodegradation of oily sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*,37, 729 – 739.
- Dworkin M. (2006) *The prokaryotes; a handbook on the biology of bacteria: symbiotic associations, biotechnology, applied microbiology*, Third ed., Springer, New York.
- Ellis, B.P., Harold, P., Kronberg, H. (1991). Bioremediation of a creosote contaminated site. *Environ. Technol.* 12, 447-459.
- Engelbreton R. R. and Wandruszka R. V. (1994). Microorganization in dissolved humic acids. *Environ. Sci. Technol.*, 28: 1934-1941.
- Fava F, Berselli S, Conte P, Piccolo A, Marchetti L (2004) Effects of humic substances and soya lecithin on the aerobic bioremediation of a soil historically contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Biotechnol Bioeng.* 88:214-23.
- Fava F, Piccolo A (2002) Effect of humic substances on the bioavailability aerobic biodegradation of polychlorinated biphenyls in a model soil. *Biothechnol Bioeng* 77:204–211.
- Fernández L., Rojas N., Roldán T., Ramírez M., Zegarra H., Uribe R., Reyes-Ávila R., Flores D., Arce J. (2006) *Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados*. Instituto Nacional de Ecología. México.

- Ferraz, C., De Araujo, A.A. & Pastore, G.M. (2002). The influence of vegetable oils on biosurfactant production by *Serratiamarcescens*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 98, 841-847.
- Ferruzzi, C. (1994). *Manuale del Lombricoltore*. Edagricole, Bologna, Italia.
- Field, J. A. & Cervantes, F. J. (2005) Microbial redox reactions mediated by humus and structurally related quinones. *Use of Humic Substances to Remediate Polluted Environments: from Theory to Practice*, Springer ,Pp. 506
- Fierer N., Bradford M. A., and Jackson R. B. (2007) toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* 88:1354–1364.
- Francioso O, Ciavatta C, Sanchez-Cortes S, Tugnoli V, Sitti L, Gessa C (2000) Spectroscopic Characterization of Organic Matter in a Long-Term Field Experiment. *Soil Sci* 165:495–504.
- Fu MH Alexander M (1995) Use of surfactants and slurring to enhance the biodegradation in soil compounds initially dissolved in non-aqueous-phase liquids. *Appl Microbiol Biotechnol* 43: 551–8.
- García-Díaz C., Ferrera-Cerrato, R., Poggi-Varaldo, H., Ríos Leal, E. and Barrera-Cortés J. (2008). Humic Acid and Earthworm Effect on the Removal of Weathered Hydrocarbons. Sixth International Conference Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds, May 19-22, 2008, Monterrey California. Paper 656.
- García-Rivero M. and Peralta-Pérez M. R. (2008). Cometabolism in the biodegradation of hydrocarbons. *Revista mexicana de ingeniería química* Vol. 7, No. 1, 1-12.
- Garon, D., Krivobok, S., Wouessidjewe, D., Seigle-Murandi, F., (2002). Influence of surfactants on solubilization and fungal degradation of fluorine. *Chemosphere* 47, 303–309.
- Glazer, A.N. y Nikaido, H. (1995). *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology*. W. H. Freeman and Company, New York.
- Gontang, E. A., Fenical, W. & Jensen, P. R. (2007). Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 73, 3272–3282.

González Garduño R. (2011) Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos utilizando lirio acuático, sustancias húmicas y un cultivo mixto hidrocarbonoclasta comercial. Universidad Tecnológica de Tecamac, Edo. Mex., México.

Goodfellow M, and Williams S. T. (1983) Ecology of Actinomycetes. *Annu Rev Microbiol*, 37:189-216

Gouy M., S. Guindon and O. Gascuel (2010). SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27(2):221-224.

Grdisa M, Popovic M, Hrzenjak T. Glycolipoprotein extract (G-90) from earthworm *Eisenia foetida* exerts some antioxidative activity. *Comp Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2001;128:821–825.

Griffiths R.A. (1995). Soil washing technology and practice. *J. Haz. Mat.*, 40, 175-189.

Guetzloff, T.F. and J.A. Rice, (1994) Does humic acid form a micelle? *Sci. Total Environ.*, Vol. 152: 31-35.

Guha S, Jaffe PR and Peters CA. (1998). Bioavailability of mixtures of PAHs partitioned into the micellar phase of a nonionic surfactant. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2317-2324.

Guindon S. and O. Gascuel (2003). PhyML-a simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52:696-704.

Hamamura N., Olson S.H., Ward D.M. and Inskeep W.P. (2006). Microbial population dynamics associated with crude oil biodegradation in diverse soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6316-6324.

Harwell JH, Sabatini DA, Knox RC (1999) Surfactants for ground water remediation. *Colloids Surf A* 151:255–268.

Hassett D J, Bisesi M S and Hartenstein R (1988) Earthworm peroxidase: Distribution, microbicidal action and molecular weight. *Soil Biol. Biochem.* 20, 887–890.

Holman HY, Nieman K, Sorensen D, Miller C, Martin M, Borch T, McKinney W, Sims R (2002) Catalysis of PAH Biodegradation by Humic Acid Shown in Synchrotron Infrared Studies. *Environ Sci Technol* 36:1276–1280.

Horvath, R.S. (1972) Microbial co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature. *Bacteriol Rev* 36:146-155.

Hou C.M., Chen Y.F., Chen W.N., Li W. (2011). Microwave-assisted methylation of cassava starch with dimethyl carbonate. *Carbohydr. Res.*, 346, 1178-1181.

Howe-Grant, M. 1996. Petroleum. *Encyclopedia of chemical technology* 4th ed. Wiley Interscience Publication. New York. pp. 342-480.

<http://www.cem.com>

Hu, W.-G., J. Mao, B. Xing, and K. Schmidt-Rohr (2000). Poly(methylene)crystallites in humic substances detected by nuclear magnetic resonance. *Environ. Sci. Technol.* 34:530–534

Huesemann, M. H. (1995) Predictive model for estimating the extent of petroleum hydrocarbon biodegradation in contaminated soils. *Environ. Sci. Technol.* 29: 7-18.

Ilyukhina E.A., Perminova I.V., Ponomarenko S.A. (2005). Synthesis of crosslinked humic materials of controlled size. Abstract book of the 10th Nordic IHSS Symposium on "Character of natural organic matter and its role in the environment", 1-3 June 2005, Riga, Latvia, 33

International Humic Substances Society; <http://www.humicsubstances.org/>

Italian Ministry of Environment, D.Lgs. No. 152/2006: Technical Regulation on Environmental Field. Ordinary Annex of the Official Italian Gazette 14.04.2006, no. 88.

Jahan K, Ahmed T, Maier WJ (1997) Factors affecting the nonionic surfactant-enhanced biodegradation of phenanthrene. *Water Environ Res* 69:317–325.

Jansen A., (1996). Structural modeling in humic acids. *Mat. Sci. Eng.*, C4, 175–179.

Jastrow, J.D., (1996). Soil aggregate formation and the accrual of particulate and mineral-associated organic matter. *Soil Biol. Biochem.* 28, 665–676

Johnsen A.R., Wick L.Y., Harms H. (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental pollution* 133, 71-84.

Johnsen AR, Karlson U (2004) Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 452–459.

Jones DM, Douglas AG, Parkes RJ, Taylor J, Giger W, Schaffner C (1983) The recognition of biodegraded petroleum-derived aromatic hydrocarbons in recent marine sediments. *Mar Pollut Bull* 14: 103–108.

Juhasz, A.L., Britz, M.L. and Stanley, G.A. (1996) Degradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas cepacia*. *Biotechnol. Lett.* 18, 577-582.

Käckera T., Hauptb E. T. K., Garmsc C., Franckec W., Steinhart H (2002) Structural characterisation of humic acid-bound PAH residues in soil by ¹³C-CPMAS-NMR-spectroscopy: evidence of covalent bonds. *Chemosphere*, Volume 48, Issue 1, Pages 117–131

Kalali A.; Ebadi T.; Rabbani A.; Sadri Moghaddam S. (2011). Response surface methodology approach to the optimization of oil hydrocarbon polluted soil remediation using enhanced soil washing. *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 8 (2), 389-400.

Kanaly R.A. and Harayama (2000). Biodegradation of high molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology*, 182(8), 2059-2067.

Kanaly RA, Bartha R (1999). Cometabolic mineralization of benzo[a]pyrene caused by hydrocarbons additions to soil. *Environ. Toxicol.Chem.* 18, 2186.

Kaplan CW and Kitts CL (2004). Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1777-1786.

Karr M (2013) Using Humic Substances in the Bioremediation of Petroleum Polluted Soils. RainGrow (environmental bioremediation).

[http://www.raingrow.com/library-docs01.html/Using Humic Substances in the Bioremediation of Petroleum Polluted Soils.pdf](http://www.raingrow.com/library-docs01.html/Using_Humic_Substances_in_the_Bioremediation_of_Petroleum_Polluted_Soils.pdf)

Kästner M (2000) Degradation of aromatic and polyaromatic compounds. In: Rehm H-J, Reed G (eds) *Biotechnology*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp 211–239

Ke L, Bao W, Chen L, Wong YS, Tam NF (2010) Effects of humic acid on solubility and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid media and mangrove sediment slurries. *Environ. Pollut.* 158: 1768–1774.

- Kemper, W.D., Rosenau, R.C. (1986). Aggregate stability and size distribution. In: Klute, A. (Ed.), *Methods of Soil Analysis, Part I*, second ed. Agron. Monogr. 9. ASA and SSSA, Madison, WI, pp. 425–442.
- Khodadoust, A. P., Bagchi, R., Suidan, M. T., Brenner, R. C., and Sellers, N. G. (2000). Removal of PAHs from highly contaminated soils found at prior manufactured gas operations. *J. Hazard. Mater.*, 80, 159-174.
- Kleber, M., Sollins, P., and Sutton R. (2007). A conceptual model of organo-mineral interactions in soils: self-assembly of organic molecular fragments into zonal structures on mineral surfaces. *Biogeochemistry*, 85:9–24.
- Kogel-Knabner I, Totsche KU, Raber B (2000) Desorption of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil in the presence of dissolved organic matter: effect of solution composition and aging. *J Environ Qual* 29:906–916.
- Kubicki J.D., Aplitz S.E. (1999). Model of natural organic matter and interactions with organic contaminants. *Organic Geochemistry*. 30: 911-927.
- Kulikova N.A., Stepanova E.V., and Koroleva O.B. (2005) Mitigating activity of humic substances: direct influence on biota. In: *Use of humic substances to remediate polluted environments: from theory to practice*, Perminova I.V., Hatfield K., Hertkorn N. (Eds.), NATO Science Series: IV: Earth and Environmental Sciences, Vol. 52, Springer, Dordrecht, The Netherlands, 285-310.
- Laha S, Tansel B, Ussawarujikulchai A (2009) Surfactant-soil interactions during surfactant-amended remediation of contaminated soils by hydrophobic organic compounds: a review. *J Environ Manage* 90:95–100.
- Larhed, M.; Olofsson, K. (2006). *Microwave Methods in Organic Synthesis*; Springer: Berlin, Germany.
- Larkin, M.A. et al. (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. In: *Bioinformatics*. Bd. 23, S. 2947-2948.
- Leadbeater NE (2011) *Microwave Heating as a Tool for Sustainable Chemistry*; CRC Press: Boca Raton, Florida, USA.

- Lattaud, C., Mora, P., Garvin, M., Locati, S. and Roulad, C. (1999) Enzymatic digestive capabilities in geophagous earthworm - origin and activities of cellulolytic enzymes. *Pedobiologia* 43:842 -850.
- Leahy, G. P. and Colwell, R. R. (1990) Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 54: 305-315.
- Lee, D.-H., Cody, R.D., Kim, D.J., Choi, S. (2002) Effect of soil texture on surfactant-based Remediation of hydrophobic organiccontaminated soil. *Environ. Int.* 27, 681–688.
- Li Z, Wincele DE, Wrenn BA. (2001) Anaerobic biodegradation of vegetable oil spills. In: Proceedings of the International Oil Spill Conference. Washington, DC: American Petroleum Institute. pp 315–321.
- Liang Y, Britt DW, McLean JE, Sorensen DL, Sims RC (2007) Humic acid effect on pyrene degradation: finding an optimal range for pyrene solubility and mineralization enhancement. *Appl Microbiol Biotechnol.* 74:1368-75.
- Liem L. E., Facey R. M., Carrigan I., Blyth J., Fischer M., and Henderson A. (2003) Enhanced Hydrocarbon Bioremediation through the addition of humic substances. In: Mining & the Environment III Conference: Sudbury 2003 - Mining and the Environment, Sudbury, Ontario, Canada.
- Loupy, A. (2006). *Microwaves in Organic Synthesis*, 2nd ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany.
- Lovley, D. Coates J. D., Blunt-Harris E. L., Phillips E. J. P. & Woodward J. C. (1996) Humic substances as electron acceptors for microbial respiration, *Nature* 382: 445-448.
- Lukasiewicz M, Bednarz S, Ptaszek A (2011) Environmental friendly polysaccharide modification - microwave-assisted oxidation of starch. *Starch-Starke* 63:268–273.
- Lundstedt S. (2003). Analysis of PAHs and their transformation products in contaminated soil and remedial processes. *Akademisk avhandling*.
- Macnaughton S.J., Stephen J.R., Venosa A.O., Davis G.A., Chang Y.J. and White D.C. (1999). Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3566-3574.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., y Parker, J. Brock *Biología de los Microorganismos*. 10ª edición. Prentice-Hall. Madrid, 2003.

- Mancera-López, M.E., Rodríguez-Casasola M.T., Ríos-Leal, E. Esparza-García, F. Chávez-Gómez, B. Rodríguez-Vázquez, R. and Barrera-Cortés J. (2007) Fungi and bacteria isolated from two highly polluted soils for hydrocarbon degradation. *Acta Chimica Slovenica*, 54(1), 201-209. (ISSN: 1318-0207).
- Mancera-López, M.E., Esparza-García, F., Chávez-Gómez, B., Rodríguez-Vázquez, R., Saucedo-Castañeda, G. and J. Barrera-Cortés (2008) Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation–bioaugmentation with filamentous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*. Vol 61/2 pp 151-160.
- Margesin, R., and F. Schinner (1997) Bioremediation of diesel-oil contaminated alpine soils at low temperatures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 462–468.
- Martínez-Palou R (2006) *Química en Microondas*, CEM Publishing: Matthews, NC, USA (E-book in spanish).
- Marschner B, Kalbitz K, 2003. Controls of bioavailability and biodegradability of dissolved organic matters in soils. *Geoderma*, 13: 211–235.
- Mata-Sandoval, J.C., Karns, J., Torrents, A. (2002). Influence of Rhamnolipids and Triton X-100 on the desorption of pesticides from soils. *Environ. Sci. Technol.*, 36, 4669-4675.
- McNally, D.L., Mihelic, J.R. and Lueking, D.R. (1999) Biodegradation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and nitrate-reducing conditions. *Chemosphere* 38, 1313-1321.
- Megharaj M, Ramakrishnan B, Venkateswarlu K, Sethunathan N, Naidu R (2011) Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environ. Int.* 37: 1362–1375.
- Megharaj M, Wittich R-M, Blasco R, Pieper DH, Timmis KN (1997) Superior survival and degradation of dibenzo-p-dioxin and bibenzofuran in soil by soil-adapted and nonadapted *Sphingomonas* sp. strain RW1. *Appl Microbiol Biotechnol* 48: 109–14.
- Menn, F-M., Easter, J. P., Saylor, G. S. (2000) Bacterial activity enhancement and soil decontamination. In H.J. Rehm, G. Reed, Pühler and P. Stadler, editors, *Biotechnology. Environmental processes II. Soil decontamination*. Wiley-VCH. Weinheim. Pp 425 – 429.

Meyer, J. (2000). Actinomycetes in Bergeys's Manual of Determinative Bacteriology ed. The Williams & Wilkins Co. New York, USA.

Montgomery, D.C. (1991). Diseño y Análisis de Experimentos. Grupo Editorial Iberoamérica, S.A. de C.V. México, D.F.

Morales Caselles, C. (2007). Caracterización de la calidad de sedimentos afectados por vertidos de petróleo: comparación entre casos de vertidos (impacto agudo) frente a derrames continuos (impacto crónico). Tesis doctoral. Universidad de Cádiz.

Morgan, M., Burrows, I. (1982) Earthworms/microorganisms interactions. Rothamsted Experimental Station Report.

Mosley R. (1998) The effects of humates on remediation of hydrocarbon and salt contaminated soils. 5th International Petroleum Environmental Conference, Albuquerque, New Mexico, October 20th – 23rd.

Mueller JG, Chapman PJ, Blattmann BO, Pritchard PH (1990) Isolation and characterization of a fluoranthene-utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilis*. *Appl Environ Microbiol* 56:1079-1086.

Mueller, J.G., Chapman, P.J., Pritchard, P.H., (1989). Creosote contaminated sites. *Environmental Science and Technology* 23, 1197-1201.

Mulligan CN, Yong RN, Gibbs BF (2001) Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Eng Geol* 60:371–80.

Myers, D. 1988. *Surfactant Science Technology*, VCH Publishers, Weinheim, Germany.

Nanny MA, Stearns C, Chen L, Andrusevich VE, Philp RP (2001) Humat-induced remediation of petroleum contaminated surface soils in environmental issues and solutions in petroleum exploration, production and refining. In Abstracts of the 8th international petroleum environmental conference, Houston (pp. 122).

Nardi, S., Sessi, E., Pizzeghello, D., Sturaro, A., Rella, R., Pargoli, G. (2002). Biological activity of soil organic matter mobilized by root exudates. *Chemosphere* 46, 1075–1081.

Nebiosso A. and Piccolo A., (2011). Basis of a Humeomics Science: Chemical Fractionation and Molecular Characterization of Humic Biosuprastructures. *Biomacromolecules*, 12, 1187–1199

- Nieman J.K.C., Sims R.C., Sorensen D.L., McLean J.E. (2005) Humic acid toxicity in biologically treated soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons and pentachlorophenol. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 49: 283–289.
- Nocentini, M., Pinelli, D., Fava, F., 2000. Bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbon mixtures: the residual concentration problem. *Chemosphere* 41, 1115–1123
- NOM-021-RECNAT-2000. Establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis.
- Noordman, W.H., Bruining, J.-W., Wietzes, P., Janssen, D.B. (2000). Facilitated transport of a PAH mixture by a rhamnolipid bio-surfactant in porous silica matrices. *J. Contam. Hydr.*, 44, 119-140.
- Oden, S. (1919). The humus acid in their chemistry physics and soil science. *Kolloid Beih* 2, 75-260.
- Ogunseitan, O.A., Olsen, B.H., (1993). Effect of 2-hydroxybenzoate on the rate of naphthalene mineralization in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38, 799-807.
- Oleszczuk P., Baran S. (2005), Kinetics of PAHs losses and relationships between PAHs properties and properties of soil in sewage sludge-amended soil, *Polycycl. Aromatic Compd.* 25; 245–269.
- Olivera, N.L., Commendatore, M.G., Delgado, O., Esteves, J.L., 2003. Microbial characterization and hydrocarbon biodegradation potential of natural bilge waste microflora. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30, 542–548.
- Ozaki, S.; Kishimoto, N.; Fujita, T. (2006). Isolation and phylogenetic characterization of microbial consortia able to degrade aromatic hydrocarbons at high rates. *Microbes Environ.* 21: 44-52.
- Pandey A, Soccol, CR, Nigam P and Soccol, VT (2000). Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology* 74, 69–80.
- Park, J. H., Zhao, X. and Voice, T. C., (2002) Development of a kinetic basis for bioavailability of sorbed naphthalene in soil slurries, *Water Res*, 36: 1620–1628.
- Peng S., Wu W., Chen J. (2011). Removal of PAHs with surfactant-enhanced soil washing: Influencing factors and removal effectiveness, *Chemosphere* 82, 1173–1177.

- Pérez-Armendáriz B., Loera-Corral O., Fernández-Linares L., Esparza-García F. and Rodríguez-Vázquez R. (2004) Biostimulation of microorganisms from sugarcane bagasse pith for the removal of weathered hydrocarbon from soil. *Lett Appl Microbiol*, 38: 373–377.
- Pérez-Carrera, E.; León, V.M.; Parra, A.G. y González-Mazo, E. (2007). Simultaneous determination of pesticides, PAH, and PBC in seawater and interstitial marine water samples, using stir bar sorptive extraction-thermal fluorine -gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. Nov 2: 1170(1-2), 82-90.
- Perez-de-Mora A., Engel M., Schloter M., (2011). Abundance and Diversity of n-Alkane-Degrading Bacteria in a Forest Soil Co-Contaminated with Hydrocarbons and Metals: A Molecular Study on alkB Homologous Genes. *Microbial Ecology*, 62, 959-972.
- Perminova I., Grechishcheva N. and Petrosyan V. (1999). Relationships between structure and Binding Affinity of Humic Substances for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relevance of Molecular Descriptors. *Environ. Sci. Technol.*, 33, 3781-3787
- Perminova IV (2006) Direct chemical modification as a promising tool for designing humic materials with tailored properties. In: *Humic substances - linking structure to functions*, Frimmel F.H., Abbt-Braun G. (Eds.), Proceedings of the 13th Meeting of the International Humic Substances Society, July 30 to August 4, 2006, pp. 37–40.
- Perminova, I.V., Hatfield K and Hertkorn N. (2005). Use of humic substances to remediate polluted environments: from theory to practice. Ed. Springer. Netherlands.
- Perminova, I.V., Kovalenko, A.N., Schmitt-Kopplin, Ph., Hatfield, K., Hertkorn, N., Belyaeva, E.Yu., Petrosyan, V.S. (2005). Design of quinonoid-enriched humic materials with enhanced redox properties. *Environ. Sci. Technol.*, 39, 8518-8524
- Perreux, L.; Loupy, A. *Tetrahedron* (2001), 57, 9199.
- Perry, J.J. (1979) Microbial cooxidation involving hydrocarbons. *Microbiol Rev* 43: 59-72.
- Petruzzelli L, Celi L, Cignetti A, Marsan FA (2002) Influence of soil organic matter on the leaching of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *J Environ Sci Health B*. 37:187-99.

Piccolo A (1994) Interactions between organic pollutants and humic substances in the environment. In: Senesi, N., Miano, T.M. (Eds.), *Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health*. Elsevier Science, Amsterdam.

Piccolo A (2002) The supramolecular structure of humic substances. A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Adv Agron* 75:57–134.

Piccolo A, Conte P. (2000) Molecular size of humic substances. Supramolecular associations versus macromolecular polymers. *Adv. Environ. Res.* 3: 508–521.

Piccolo A, Conti P, Patti AF (2006) O-alkylation of lignite humic acid by phase-transfer catalysis. *Anal Bioanal Chem* 384:994–1001.

Piccolo A. (1996) *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Elsevier, The Netherlands.

Piccolo A., Conte P., Cozzolino A., Spaccini R. (2001). Molecular sizes and association forces of humic substances in solution, in C.E. Clapp, Hayes M.H.B., Senesi N., Bloom P., Jardine P.M. (Editors). *Humic Substances and Chemical Contaminants*, Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wis., 89-118.

Piccolo A., Nardi S. and Concheri G., (1996). Macromolecular changes of humic substances induced by interaction with organic acids. *European Journal of Soil Science*, 47, 319-328.

Pineda-Flores G, Mesta-Howard AM. (2001). Petroleum asphaltenes: generated problematic and possible biodegradation mechanisms. *Rev Latinoamericana de Microbiología*, 43: 143-150.

Pizl, V., Novakova, A., 2003. Interactions between microfungi and *Eisenia Andrei* (Oligochaeta) during cattle manure vermicomposting. *Pedobiologia* 47, 895–899.

Posada D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25: 1253-1256.

Providenti, M.A., Lee, H., Trevors, J.T., (1993). Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. *Journal of Industrial Microbiology* 12, 379-395.

Quadri G, Chen X, Jawitz JW, Tambone F, Genevini P, Faoro F, Adani F (2008) Biobased surfactantlike molecules from organic wastes: the effect of waste composition and composting process on surfactant properties and on the ability to solubilize tetrachloroethene (PCE). *Environ Sci Technol* 42:2618–23.

- Quatrini P., Scaglione G., De Pasquale C., Reila S. and Puglia A.M. (2008). Isolation of Gram-positive n-alkane degraders from a hydrocarbon contaminated Mediterranean shoreline. *J. Appl. Microbiol.* 104: 251- 259.
- Quintero, L. R. (2002). Formación de humus y dinámica enzimática en el proceso de vermicompostaje. Tesis de Doctorado, Edafología, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México, México.
- Radwan AA, Alanazi FK, Alsarra IA (2010) Microwave Irradiation-Assisted Synthesis of a Novel Crown Ether Crosslinked Chitosan as a Chelating Agent for Heavy Metal Ions (M(+n)). *Molecules* 15:6757–6268.
- Rapp P. and Gabriel-Jürgens L.H.E. (2003) Degradation of alkanes and highly chlorinated benzenes, and production of biosurfactants, by a psychrophilic *Rhodococcus* sp. and genetic characterization of its chlorobenzene dioxygenase. *Microbiology*, 149: 2879 - 2890.
- Richel A., Laurent P., Wathelet B., Wathelet J.P., Paquot M., (2011). Current perspectives on microwave-enhanced reactions of monosaccharides promoted by heterogeneous catalysts. *Catal. Today*, 167, 141-147.
- Rieser-Roberts, E. (1998) Biodegradation / Mineralization / Biotransformation / Bioaccumulation of petroleum constituents and associated metals. Section 3. In: Remediation of petroleum contaminated soils. Biological, physical and chemical processes. Lewis Publishers. Boca Raton, CRC Press.
- Ríos-Rodríguez L.A. (2011). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos utilizando lirio acuático, sustancias húmicas y un cultivo mixto hidrocarbonoclasta. Universidad Tecnológica de Tecamac, Edo. Mex., México.
- Rennie, R.J. (1981). A single medium for the isolation of acetylenereducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Can. J. Microbiol.* 27: 8-14.
- Romero A., Santos A., Cordero T., Rodríguez-Mirasol J., Rosas J.M., Vicente F. (2011). Soil remediation by Fenton-like process: Phenol removal and soil organic matter modification. *Chem. Eng. J.*, 170, 36-43.
- Rossini, F. D., "Hydrocarbons in Petroleum," *Journal of Chemical Education*, Vol. 37, 1960, pp. 554-561.

- Salati S, Papa G, Adani F (2011) Perspective on the use of humic acids from biomass as natural surfactants for industrial applications. *Biotechnol Adv* 29:913–922.
- Sambrook J and Russell D (2001). *Molecular cloning: A laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring, Harbord Laboratory Press, New York.
- Sandbacka M, Christianson I, Isomaa B (2000) The acute toxicity of surfactants on fish cells, *Daphnia magna* and fish – a comparative study. *Tox Vitro* 14: 61–68.
- Saparpakorn P, Kim JH, Hannongbua S (2007) Investigation on the Binding of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons with Soil Organic Matter: A Theoretical Approach. *Molecules* 12: 703-715.
- Sawada A.; Kanai K. and Fukushima M. (2004). Preparation of artificial spiked soil with polycyclic aromatic hydrocarbons for soil pollution analysis. *Analytical Science*, 20(1):239-41
- Schuler, L., Ní Chadhain, S.M., Jouanneau, Y., Meyer, C., Zylstra, G.J., Hols, P. and S.N. Agathos (2008). Characterization of a novel angular dioxygenase from luorine-degrading *Sphingomonas* sp. strain LB126. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 1050-1057.
- Sehlin E. (2004). A study of the availability of PAHs and oxygenated PAHs in a contaminated soil. Degree project in chemistry, Department of chemistry, Environmental chemistry, Umea University, Sweeden. 20 pages.
- Semple KT, Doick KJ, Jones KC, Burauel P, Craven A, Harms H (2004) Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environ Sci Technol* 38: 228A–31A.
- Senesi N., Miano T. M., Provenzano M. R. and Brunetti G. (1991). Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Sci.* 152: 259-271.
- Sheng Peng, Wei Wu, Jiajun Chen (2011). Removal of PAHs with surfactant-enhanced soil washing: Influencing factors and removal effectiveness. *Chemosphere* 82, 1173–1177.
- Shiaris, M.P. (1989). Seasonal biotransformation of naphthalene, phenantrene and benzo(a)pyrene in surfacial estuaring sediments. *Applie and environmental microbiology*, 55(6), 1391-1399.
- Simpson M.J., Chefetz B. and Hatcher P.G. (2003). Phenanthrene sorption to structurally modified humic acids. *J. Environ. Qual.* 32:1750–1758.

Singleton, D.R., P.F. Hendrix, D.C. Coleman and W.B. Whitman, 2003. Identification of uncultured bacteria tightly associated with the intestine of the earthworm *Lumbricus rubellus* (Lumbricidae: Oligochaeta). *Soil Biol. Biochem.*, 35: 1547-1555.

Spinelli, L.F., Schnaid, F., Selbach, P.A., Bento, F.M., Oliveira, J.R. (2005). Enhancing bioremediation of diesel oil and gasoline in soil amended with an agroindustry sludge. *Journal of the Air and Waste Management Association* 55, 421–429.

Stach, J.E., Burns, R.G. (2002). Enrichment versus biofilm culture: a functional and phylogenetic comparison of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading microbial communities. *Environmental Microbiology* 4, 169-182.

Sticher, P., Jaspers, M. C. M., Stemmler, K., Harms, H., Zehnder, A. J. B. and van der Meer, J. R. (1997) Development and characterization of a whole-cell bioluminescent sensor for bioavailable middle-chain alkanes in contaminated groundwater samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 4053-4060.

Stringfellow, W. T. and M. D. Aitken. 1995. Competitive metabolism of naphthalene, methylnaphthalenes, and fluorene by phenanthrene degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:357-362.

Sun GD, Xu Y, Jin JH, Zhong ZP, Liu Y, Luo M, Liu ZP (2012) Pilot scale ex-situ bioremediation of heavily PAHs-contaminated soil by indigenous microorganisms and bioaugmentation by a PAHs-degrading and bioemulsifier-producing strain. *J Hazard Mater.* 72: 233-234.

Tadros M.G., Hughes J.B. (1997) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by indigenous mixed and pure cultures isolated from coastal sediments. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 865: 63-65.

Tan K. H., 2003. *Humic Matter in Soil and the Environment. Principles and Controversies*, Marcel Dekker Inc., ISBN 0-8247-4272-9

Tecnología Especializada en el Medio Ambiente; <http://www.tecnologiaespecializada.net/>

Terashima M, Tanaka S, Fukushima M (2007) Coagulation characteristics of humic acid modified with glucosamine or taurine. *Chemosphere* 69:240–246.

- Tiehm A., Fritzsche C., (1995) Utilization of solubilized and crystalline mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by a *Mycobacterium* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42: 964-968.
- Trzesicka-Mlynarz, D., Ward, O.P. (1995). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH-contaminated soil. *Canadian Journal of Microbiology* 41, 470-476.
- Trzesicka-Mlynarz, D., Ward, O.P. (1996). Degradation of fluoranthene in a soil matrix by indigenous and introduced bacteria. *Biotechnology Letters* 18, 181-186.
- Tschapek M., Wasowski C. and Torres-Sánchez R. M., (1981). Humic acid as a colloidal surfactant. *Plant and Soil* 63, 261-271
- Turgay OC, Erdogan EE, Karaca A (2009) Effect of humic deposit (leonardite) on degradation of semi-volatile and heavy hydrocarbons and soil quality in crude-oil-contaminated soil. *J Environ Monit Assess.* 4.
- Vacca, D.J., Bleam, W.F., Hickey, W.J. (2005). Isolation of soil bacteria adapted to degrade humic acid-sorbed phenanthrene. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 3797–3805.
- Van Beilen Beilen J.B. and Funhoff E.G. (2007). Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 13-21.
- Van Herwijnen R, Wattiau, P., Bastiaens L., Daal, L., Jonker L., Springael D., Govers, H.A.J and Parsons J.R. (2003). Elucidation of the metabolic pathway of fluorine and cometabolic pathways of phenanthrene, fluoranthene, anthracene and dibenzothiophene by *Sphingomonas* sp. LB126. *Research in microbiology*, 154, 199-206.
- Vangronsveld J., Herzig R., Weyens N., Boulet J., Adriaensen K., Ruttens A., Thewys T., Vassilev A., Meers E., Nehnevajova E., van der Lie D., Mench M. (2009). Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environmental Science and Pollution Research*, 16, 765-794.
- M. Vidali (2001) Bioremediation. An overview, *Pure Appl. Chem.*, 73(7) 1163.
- Vogel TM (1996) Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Curr Opin Biotech* 7: 311–316.

- Volkering F, Breure AM, Rulkens WH (1998) Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation* 8:401–417.
- Walter, U., Beyer, M., Klein, J., Rehm, H.J. (1991). Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. *Applied Microbiology and Biotechnology* 34, 671-676.
- Wandruszka R. V. (2000) Humic acids: Their detergent qualities and potential uses in pollution remediation. *Geochem. Trans.*, 2.
- Weissenfels, W., Beyer, M., Klein, J. (1990). Degradation of phenanthrene, fluorene and fluoranthene by pure bacterial cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32:479-484.
- Wershaw, R. L. (1989) Application of a membrane model to the sorptive interactions of humic substances *Environmental Health Perspectives* Vol. 83, pp. 191-203.
- Whyte L.G., Bourbonnere L., Greer C.W. (1997) Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways. *Appl Environ Microbiol*, 3719- 3723.
- Wijnja H., Pignatello J. J., Malekani K (2004) Formation of π - π Complexes between Phenanthrene and Model π -Acceptor Humic Subunits. *J. Environ. Qual.*, 33: 265–275.
- Xiaoqiang, C., Hua, F., Xuedong, P., Xiao,W., Min, B.F., Yunlong, Y. (2007). Degradation of chlorpyrifos alone and in combination with chlorothalonil and their effects on soil microbial populations. *Journal of Environmental Sciences* 20, 464-469.
- Yanf L., Li G., Yang F., Zhang S.M., Fan H.X., Lv. X.N. (2011). Direct conversion of cellulose to 1- (furan-2-yl)-2-hydroxyethanone in zinc chloride solution under microwave irradiation. *Carbohydr. Res.*, 346, 2304-2307.
- Yu K.S.H., Wong A.H.Y., Yau K.W.Y., Wong Y.S., Tam N.F.Y. (2005) Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. *Mar Pollut Bull* 51: 1071–1077.
- Yuan, S.Y., Wei S.H., Chang B.V. (2000). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture. *Chemosphere* 41: 1463-1468.

Zhang G-L, Zhang L, Deng H, Sun P (2011) Preparation and characterization of sodium carboxymethyl cellulose from cotton stalk using microwave-heating. *J Chem Technol Biotechnol* 86:584–589.

Zhang, S. P. and Rusling, J. F. (1995). Dechlorination of polychlorinated biphenyls on soils and clay by electrolysis in a biocontinuous microemulsion. *Environ. Sci. Technol.*, 29, 1195-1199.

Zhao X., He J.-X., Zhan Y.-Z. (2009). Synthesis and Characterization of Chitosan Biguanidine Hydrochloride under Microwave Irradiation. *Polymer J.*, 41, 1030-1035.

Zhou, H.W., Luan, T.G., Zou, F., Tam, N.F. (2008). Different bacterial groups for biodegradation of three- and four-ring PAHs isolated from a Hong Kong mangrove sediment. *Journal of Hazard Materials* 152, 1179-1185.

A1 Fundamentos de las reacciones de eterificación/esterificación

Esterificación

Se denomina esterificación al proceso por el cual se sintetiza un éster. Un éster es un compuesto derivado formalmente de la reacción química entre un ácido carboxílico y un alcohol. La reacción de la esterificación pasa por un ataque nucleofílico del oxígeno de una molécula del alcohol al carbono del grupo carboxílico. El protón migra al grupo hidroxilo del ácido que luego es eliminado como agua. El rol del catalizador es el de aumentar la actividad carbonílica (la carga parcial positiva sobre el átomo de carbono) por protonación de uno de los oxígenos del ácido. Lo mismo se puede conseguir utilizando derivados más activos del ácido como los haluros o los anhídruos.

Eterificación

Se denomina eterificación al proceso por el cual se sintetiza un éter. Un éter es un compuesto derivado formalmente de la reacción química entre un grupo hidroxilo y un alcohol. Y el mecanismo de reacción es igual al mencionado anteriormente.

Catálisis de transferencia de fase

Muchas reacciones deseables no pueden llevarse a cabo porque los reactivos son inaccesibles entre ellos mismos. La dificultad fundamental de reunir el reactivo nucleófilo soluble en agua y reactivo electrófilo orgánico insoluble en agua ha sido tradicionalmente resuelta mediante la adición de un disolvente que es tanto soluble en agua y como n disolventes orgánicos (como el etanol, que deriva su

naturaleza hidrofílica de su grupo hidroxilo y su lipofilia del grupo de etilo). Sin embargo, la tasa de aceleración es mínima debido a la excesiva solvatación del nucleófilo.

El principio de la catálisis de transferencia de fase (CTF) se muestra en la **Figura 66**, la cual se basa en la capacidad de ciertos "agentes de transferencia de fase" (los catalizadores de transferencia de fase, como el hidróxido de tetrabutilamonio, HTBA o el bromuro de tetrabutilamonio, BTBA) para facilitar el transporte de un reactivo de una fase a otra fase (inmiscibles) en el que existe otro reactivo. Así, la reacción es posible gracias a que reúne a los reactivos que están originalmente en diferentes fases. Sin embargo, también es necesario que la especie se transfiera se encuentre en un estado activo para que la eficacia de la reacción catalítica se incremente y que se regenera durante la reacción orgánica.

En la imagen se muestra como el catalizador HTBA interacciona con el compuesto de interés a ser transformando en la fase acuosa permitiendo su interacción en la fase orgánica en la cual el compuesto de interés no es miscible. El HTBA al ser miscible en las dos fases permite la interacción del haluro de alquilo con el compuesto de interés, el cual puede o no permanecer en esta fase (orgánica). El proceso se repite indefinidamente hasta la completa interacción de los reactivos en condiciones ambientales por lo general.

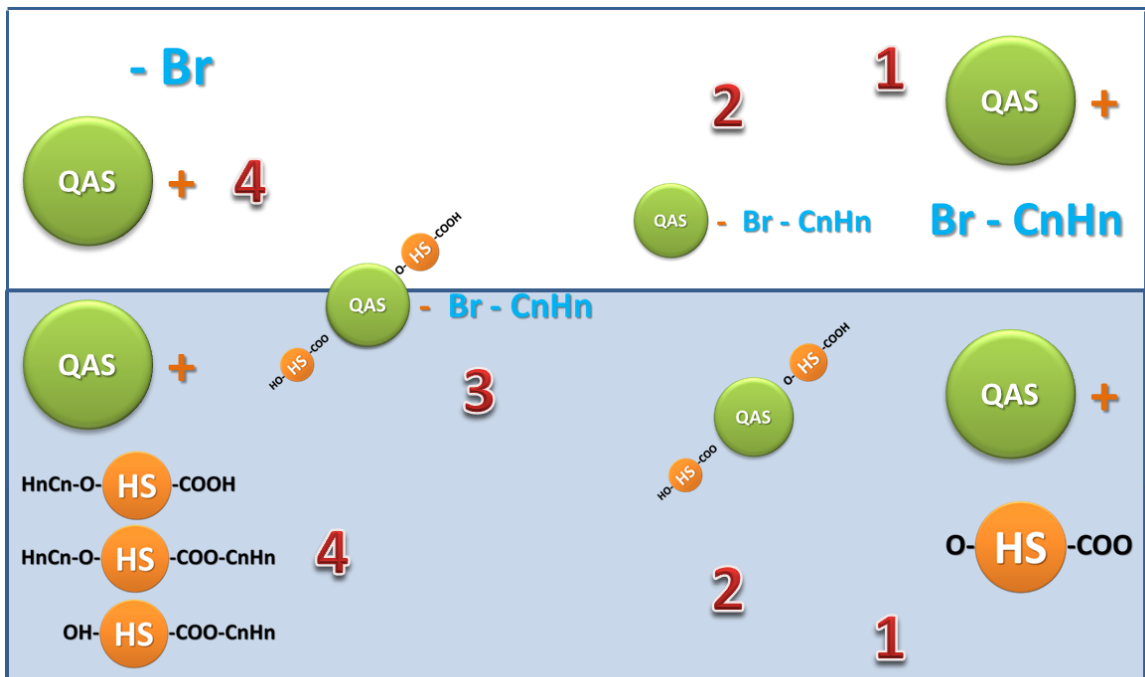


Figura 66. Principio de la catálisis de transferencia de fase para el sistema agua, sal cuaternaria de amonio (QAS) y sustancias húmicas (HS)

Microondas: principios y aplicaciones

A pesar de estos avances, los aspectos prácticos en el manejo de las reacciones químicas han sufrido pocos cambios y en este nuevo siglo aún existen muchas limitaciones para la química convencional, una de ellas son los tiempos de reacción, debido a que la mayor parte de las reacciones que fueron descritas hace más de medio siglo requiere tiempos muy largos para la completa transformación de los reaccionantes en productos; en muchas ocasiones son necesarias drásticas condiciones de temperatura y en algunos casos de presión. Otro aspecto neurálgico es el empleo de grandes volúmenes de disolvente, en su mayor parte de elevada toxicidad, tanto cuando se emplean como medio de reacción, como cuando se utilizan en los procesos de purificación de cantidades relativamente pequeñas de productos. En las últimas décadas se han empezado a explorar nuevas síntesis con el uso de métodos "no convencionales" para acelerar o promover el curso de las reacciones, por ejemplo, Diversas fuentes de irradiación, como el infrarrojo, ultravioleta, ultrasonido, las descargas de plasma y las reacciones en fluidos supercríticos, ofrecen ahora nuevas e interesantes alternativas para lograr las transformaciones químicas deseadas.

Dentro de las alternativas "no convencionales de síntesis" la aplicación de las microondas ha ganado gran popularidad como un modo eficaz de acelerar las reacciones químicas, incrementar los rendimientos y la selectividad de dichas transformaciones, así como disminuir la formación de productos colaterales. No es sorprendente, por tanto, el interés creciente de los laboratorios académicos, de investigación e industriales por el uso de estos procedimientos, que se ha reflejado en una elevada productividad científica con el empleo de dicha tecnología.

Al mismo tiempo, las microondas (MW, por sus siglas en inglés) han sido progresivamente empleadas para ayudar a la síntesis de una amplia gama de compuestos orgánicos de una manera simple, rápida y eficiente. Además, la irradiación de microondas es una metodología "verde" en síntesis orgánica debido a la eficiencia en el tiempo de la reacción y la reducción de disolvente orgánico volátil utilizado durante una reacción por calentamiento convencional.

Los llamados perfiles de reacción limpia de MW es el calentamiento, generalmente acompañado por/y probablemente conectado a mejores rendimientos y purezas, han sido ampliamente explotados para

lograr transformaciones generales sintéticas (Loupy 2006, Larhed y Olofsson 2006, Martínez-Palou 2006, Leadbeater 2011). Las microondas se ha aplicado con éxito para la modificación química de macromoléculas naturales como el quitosano (Zhao et al. 2009), celulosa (Radwan et al. 2010, Hou et al. 2011), almidón (Lukasiewicz et al. 2011, Yanf et al. 2011), y otros hidratos de carbono (Zhang et al. 2011), pero en el mejor de nuestro conocimiento, es la primera vez que se emplea microondas para las modificaciones química de las sustancias húmicas (SH).

Una microonda, es una forma de energía electromagnética que se ubica en la zona de bajas frecuencias en el espectro electromagnético, localizada en la región de longitud de onda entre 1mm - 1m, 300-30000MHz, (0.3-300GHz), entre el infrarrojo y las ondas de radio (Figura 67). Por ser radiaciones de baja energía, sólo afectan los movimientos moleculares, pero no la estructura molecular.

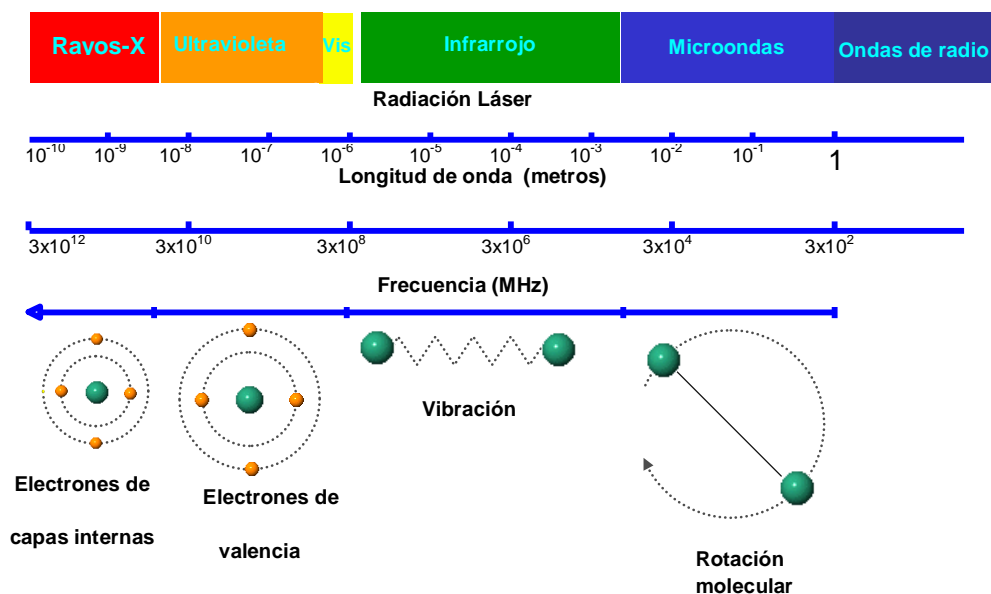


Figura 67. Ubicación de la región de las microondas en el Espectro Electromagnético

Las radiaciones de las microondas pueden ser reflejadas, en el caso de los metales, transmitidas por materiales que no se calienta por efecto de esta radiación, y absorbida para el caso de los materiales que contiene cierta polaridad.

Las microondas se mueven a la velocidad de la luz. La energía de los fotones de microondas es muy cercana a 1 J/mol, muy baja en relación a la energía típica requerida para provocar la ruptura de un enlace covalente (la energía de un enlace simple C-C es de 347 KJ/mol), ni aún suficiente para la ruptura de un enlace de van der Waals (2.5 J/mol); así, las microondas no tiene suficiente energía para afectar la estructura de las moléculas orgánicas.

A diferencia del método de calentamiento por conducción/convección, el calentamiento por microondas no depende de la conductividad térmica del recipiente que contiene el material a calentar, esta radiación interactúa directamente con las moléculas presentes en la mezcla de reacción y como consecuencia se produce un supercalentamiento localizado.

El supercalentamiento es el fenómeno que provoca que el punto de ebullición de los disolventes irradiados a presión atmosférica, puedan incrementarse varios grados por encima de la temperatura a la que ebullicen por calentamiento convencional. La componente eléctrica de la radiación es la responsable del calentamiento dieléctrico de las sustancias, el cual se produce a través mecanismos como:

Mecanismo de polarización dipolar: Para que una sustancia genere calor cuando es irradiada con microondas, esta debe poseer un momento dipolo. Un dipolo es sensible a un campo magnético y tenderá a alinearse con el campo. Para el caso del campo aplicado en la región de las microondas, las moléculas son capaces de rotar, pero no alcanzan a alinearse al campo, lo cual genera una diferencia de fase que causa que las moléculas pierdan energía por colisiones o fricciones, lo que se conoce como calentamiento dieléctrico.

Mecanismo de conducción iónica: Cuando la muestra irradiada es un conductor eléctrico, los acarreadores cargados (iones o electrones) se mueven a través de la muestra bajo la influencia de un campo eléctrico, estas corrientes inducidas provocan el calentamiento instantáneo de la muestra debido a la resistencia eléctrica del material y a que el movimiento iónico incrementa el número de colisiones.

Factor de pérdida dieléctrica: La polarización dieléctrica depende fundamentalmente de la facilidad con que los dipolos se reorientan ante un campo eléctrico aplicado, por lo cual los disolventes con constante dieléctrica elevada (más polares) absorben más rápidamente la energía de las microondas y en consecuencia se calientan más rápidamente.

Estos fenómenos, en conjunto con el supercalentamiento, son considerados los factores que pueden explicar el considerable incremento en la velocidad de las reacciones con irradiación de microondas respecto a las mismas con calentamiento convencional, situación que nos brinda seguridad, eficacia y velocidad en el proceso.

El horno de microondas Discover™ de la compañía CEM fue diseñado para su uso en laboratorios de síntesis. Es un horno monomodal en el que la radiación está directamente focalizada al área de reacción y para un trabajo óptimo con pequeñas cantidades de muestra, lo cual permite una homogénea distribución del campo eléctrico y en consecuencia un calentamiento más eficiente y mayor reproducibilidad en los resultados obtenidos.

En la **Figura 68** se muestra un diagrama representativo de la cavidad monomodal de forma circular. Esta cavidad no requiere una guía de onda por estar diseñada para que la radiación se emita de manera alternada a través de las diferentes rendijas de salida que rodean la muestra.

La cavidad se adapta a recipientes de diferentes formas y volúmenes entre 5-125 mL para recipientes abiertos y de 0.25-80 mL en recipientes sellados. Su diseño circular y con múltiples salidas de la radiación favorece la reproducibilidad de resultados.

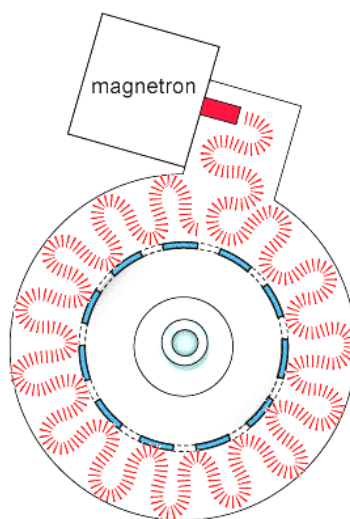


Figura 68. Diagramas representativos de una cavidad monomodal

En la **Figura 69** se muestra el reactor Discover® con el sistema BenchMate que se emplea para el desarrollo de reacciones en sistemas cerrados. El sistema BenchMate garantiza el trabajo de manera segura a elevadas presiones, pues los viales contienen una tapa de seguridad (intelliVent) que libera la sobrepresión y evita que el operador manipule el vial de reacción cuando no ha alcanzado la presión normal.



Figura 69. Horno monomodal Discover™

B2 Extracción de HTP (EPA 3550b)

Se elabora un cartucho de papel filtro Whatman de tal forma que pueda almacenar suelo en su interior y se pone a peso constante (colocarse guantes de látex para evitar transferir humedad y grasa a los cartuchos). Se determina la humedad del suelo a analizar. Posteriormente se pesa aproximadamente un gramo de suelo colocándolo en el cartucho. Se coloca el cartucho con muestra en un frasco de vidrio de 4.5 × 10cm con tapa y se adicionan 40ml de diclorometano. Se sónica la muestra empleando un equipo de ultrasonido Branson® DHA-1000 durante 40min. Esta operación se hace por triplicado. El sobrenadante se trasvasa a otro frasco de vidrio y se permite la evaporación del diclorometano hasta sequedad para llevar a cabo la recuperación de asfaltenos. El cartucho posteriormente se lleva a peso constante, para determinar la concentración de HTP (ppm) se aplica la siguiente fórmula:

$$HTP's (ppm) = \frac{\left(\left(g \text{ suelo} - \left(g \text{ suelo} \times \frac{\%H}{100} \right) \right) + g \text{ cartucho}_{\text{peso cte}} \right) - g \text{ cartucho sin HTP's}_{\text{peso cte}}}{\left(g \text{ suelo} \times \frac{\%H}{100} \right)} \times 10^6$$

Recuperación de Asfaltenos

Empleando los HTP obtenidos se la etapa anterior se adicionan 40ml de pentano y se coloca en el frasco un agitador magnético y se agita por 10min (se observa inmediatamente la precipitación del asfaleno). Posteriormente la mezcla se centrifuga a una velocidad de 10,000 rpm, a una temperatura de 4 °C, también por 10 minutos, se realiza una decantación y con el precipitado que se vaya obteniendo, se repite la misma operación cuatro ocasiones, (dilución, agitación y centrifugación), el sobrenadante se va aclarando en cada operación pero no llega a ser incoloro. Tanto del precipitado como del sobrenadante se evapora el solvente y se cuantifica asfaltenos en el primero e hidrocarburos ligeros en el segundo.

Fraccionamiento de Hidrocarburos Ligeros (sin asfaltenos)

Los hidrocarburos ligeros se separan en tres fracciones que son alifáticos, aromáticos poli cíclicos y saturados por el método de cromatografía en columna. Se emplea una columna de vidrio de 20 cm de longitud con diámetro interior de 0.85 cm, empacada con sílica gel (malla 60 – 200); primero se coloca en su parte interior un tapón de fibra de vidrio para evitar la sílica sea arrastrada por el solvente, después la columna se llena con hexano, purgando en repetidas ocasiones para sacar todas las burbujas de aire atrapadas y después se adiciona sílica gel activada previamente (24 horas a 100°C), cuidando que no queden burbujas de aire atrapadas.

Primera fracción (hidrocarburos Alifáticos). Se pesan 0.1 g de hidrocarburos ligeros (libres de asfaltenos), se disuelven en hexano y se colocan en la parte superior de la columna. El eluyente para la primer fracción es hexano con este solvente se obtienen los hidrocarburos alifáticos, que producen una coloración verde-amarillo tenue, esta y todas las fracciones a recuperar se deben recibir en un vaso de precipitados de 100 ml puestos anteriormente a peso constante, para cuantificar los hidrocarburos correspondientes. La obtención de esta primera fracción tarda aproximadamente 6:30 h, siendo el criterio para concluir esta separación la aparición gradual de una mancha amarilla. Se recomienda montar en la parte superior de la columna de fraccionamiento un matraz de separación con el solvente que se esté alimentando a la columna, igualando los flujos de entrada y de salida de la columna que es aproximadamente de 20 gotas por minuto.

Segunda fracción (hidrocarburos Aromáticos). Se adicionó un eluyente compuesto por benceno – hexano (1:3). Con éste se fraccionarán los hidrocarburos aromáticos que producen una coloración amarillo brillante. La obtención de esta fracción demora unas 5:00 h misma que se da por terminada cuando el efluente sea incoloro.

Tercera fracción (hidrocarburos Policíclicos Aromáticos). Se cambia la adición del solvente a otro compuesto por acetona – metanol (1:1), con el que se obtiene la tercera fracción que componen los hidrocarburos saturados y que producen una coloración café, esta fracción se obtiene en aproximadamente 3:00 horas y el criterio para concluir la recuperación de ésta es también cuando el efluente sea totalmente incoloro.