



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE YUCATÁN

FACULTAD DE INGENIERÍA

UNIDAD DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**“EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE
FENANANTRENO SOBRE EL CRECIMIENTO DE UN
CONSORCIO BACTERIANO”**

TESIS

PRESENTADA POR:

I.Q.I ALEXANDRA ISELA LÓPEZ PADILLA

EN OPCIÓN AL GRADO DE

MAESTRA EN INGENIERÍA

OPCIÓN AMBIENTAL

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2017



UADY
FACULTAD DE
INGENIERÍA

Mérida, Yuc., 09 de febrero de 2017.

**I.Q.I. ALEXANDRA ISELA LÓPEZ PADILLA
PRESENTE.**

Tengo a bien informarle que la Comisión de Tesis ha revisado y aprobado el trabajo denominado:
**“EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE FENANTRENO SOBRE EL
CRECIMIENTO DE UN CONSORCIO BACTERIANO”**, asesorado por el Dr. Carlos Alberto
Quintal Franco, autorizándole la impresión de los ejemplares necesarios.

FACULTAD DE INGENIERÍA
UNIVERSIDAD YUCATÁN
“LUZ, CIENCIA Y VERDAD”
UNIDAD DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN
I.C. CARLOS ALBERTO QUINTAL FRANCO, DR.
DIRECTOR DE LA UNIDAD DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

c.c.p.- Expediente del Candidato a Grado.

Av. Industrias No Contaminantes por Anillo Periférico Norte s/n Apdo. Postal 150 Cordemex
Tels. (999) 930-05-50, 930-05-53, 930-05-55, 930-05-66, 930-05-60. Fax: (999) 930-05-59
Mérida, Yucatán, México

Aunque este trabajo hubiera servido para el Examen de Grado y fuera aprobado por el Sínodo, sólo el autor es responsable de las Doctrinas emitidas en él.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Universidad Autónoma de Yucatán, por su apoyo y patrocinio para la realización de este proyecto de tesis.

Avances de esta investigación se presentaron en formato cartel con el título “Efectos de las concentraciones de fenantreno en bacterias” en el XV Congreso Internacional y XXI Congreso Nacional de Ciencias Ambientales, de la Academia Nacional de Ciencias Ambientales (ANCA), celebrado del 15 al 17 de junio de 2016 en la ciudad de Oaxaca, Oaxaca, México.

RESUMEN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) son compuestos tóxicos, algunos son carcinógenos, mutagénicos y tienen una mayor permanencia en el ambiente. Existen microorganismos capaces de utilizar HAP's como única fuente de carbono y energía. Estos microorganismos han sido utilizados exitosamente para la biodegradación de HAP's. Los consorcios microbianos son una forma más efectiva de conducir a la biodegradación de estos compuestos. Entre estos se encuentra el fenantreno, que es considerado un contaminante prioritario entre los 16 que se enlistan en la *Environmental Protection Agency* (EPA) y es también utilizado para modelar la degradación de HAP's.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad degradadora de un consorcio microbiano a diferentes concentraciones de fenantreno. El proceso se llevó a cabo en reactores de lecho fluidizado en modo batch, usando carbón activado como soporte, a tres diferentes concentraciones, 60, 200 y 600 ppm de fenantreno. Se realizó una cinética de 15 días en agua de mar estéril. Para cada una de las concentraciones se monitoreó el pH, el crecimiento poblacional y las concentraciones de fenantreno. Se obtuvieron curvas de crecimiento microbiano y se determinaron los porcentajes de degradación.

Con base en los resultados experimentales y análisis realizados, se concluyó que la variación de la concentración de fenantreno en el medio tiene un efecto en el crecimiento de los microorganismos y su capacidad degradadora. Esto se comprueba debido a que a la concentración de 600 ppm se tuvo un porcentaje de degradación de 52.5 %. A esta concentración se obtuvo un porcentaje de pérdida en los microorganismos de 18 %. Al finalizar la prueba la cantidad de microorganismos fue menor que la inoculada en el reactor. A la concentración de 60 y 200 ppm el consorcio fue capaz de adaptarse al medio. Lo anterior se ve reflejado en los porcentajes de degradación para cada condición, que fueron de 59.9 y 79.53 % respectivamente.

ABSTRACT

The Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (HAP's) are toxic compounds, some are carcinogenic, mutagenic and they have a longer stay in the environment. There are microorganisms capable of using HAP's as sole source of carbon and energy. These microorganisms have been used successfully for biodegradation of HAP's. The microbial consortia are a more effective way to lead to the biodegradation of these compounds. The phenanthrene besides being considered a priority pollutant among the 16 are listed by the Environmental Protection Agency (EPA), it's also used as a model in HAP's degradation.

The objective of this research study was to evaluate the degradative ability of a microbial consortium to different concentrations of phenanthrene. The process was carried out in fluidized bed reactors in batch mode, using activated carbon as a support, at three different concentrations, 60, 200 and 600 ppm of phenanthrene. The kinetics was performed 15 days in sterile seawater. For each concentrations tested pH, microbial growth and phenanthrene concentrations were monitored. Microbial growth curves were obtained and the degradation percentages were determined.

Based on experimental results and subsequent analysis, it was concluded that the variation of the concentration of phenanthrene in the medium has an effect on growth and degradation. This is verified because at the concentration of 600 ppm the degradation percentage was of 52.5 %. At this concentration the loss percentage of microorganisms was of 18 %. After the test, the amount of microorganisms was lower than inoculated in the reactor. This shows that the concentration affects the growth of microorganisms and their degradative capacity. At the concentration of 60 and 200 ppm the consortium was able to adapt to the medium. This is reflected in the percentages of degradation for each condition, which were 59.9 and 79.53 %, respectively.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	OBJETIVOS.....	2
2.1	Objetivo general.....	2
2.2	Objetivos específicos.....	2
III.	MARCO TEÓRICO.....	3
3.1	Contaminación por Hidrocarburos Aromáticos.....	3
3.1.1	Fenantreno.....	6
3.2	Uso de microorganismos en la biorremediación.....	7
3.3	Biorreactores.....	9
3.3.1	Biorreactores de lecho móvil.....	9
3.3.2	Formación de la biopelícula en el soporte.....	10
3.4	Crecimiento microbiano.....	11
3.5	Modelos de crecimiento bacteriano.....	13
3.5.1	Modelo de crecimiento Gompertz.....	14
IV	METODOLOGÍA.....	15
4.1	Diagrama general de la metodología.....	15
4.2	Pruebas preliminares.....	16
4.2.1	Crecimiento del consorcio.....	16
4.2.2	Activación del carbón.....	16
4.2.3	Contacto del carbón con el consorcio microbiano.....	17
4.2.4	Recolección del agua de mar y tratamiento.....	18
4.3	Operación del reactor.....	19
4.3.1	Alimentación al reactor.....	20

4.3.2 Muestreo y análisis de las muestras	21
4.3.3 Proceso de extracción líquido-líquido.....	21
4.3.4 Proceso de extracción sólido-líquido.....	22
4.3.5 Conteo de poblaciones microbianas	24
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
5.1 Validación del método cromatográfico	25
5.2 Efecto del fenantreno a 60 ppm sobre el consorcio microbiano	25
5.3 Efecto del fenantreno a 200 ppm sobre el consorcio microbiano	28
5.4 Efecto del fenantreno a 600 ppm sobre el consorcio microbiano	30
5.5 Estimación de parámetros del modelo Gompertz.....	32
5.5.1 Ajuste del modelo a 60 ppm de fenantreno	33
5.5.2 Ajuste del modelo a 200 ppm de fenantreno	38
5.6 Evaluación de las diferentes concentraciones	44
VI. CONCLUSIONES	47
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 Estructura química de los HAP's prioritarios de acuerdo con la EPA	5
Figura 3.2. Estructura molecular del fenantreno	7
Figura 3.3. Curva característica de crecimiento microbiano.....	12
Figura 4.1 Esquema general de trabajo	15
Figura 4.2 a) y b) Solución de agua de mar y fenantreno y carbón con inóculo, c) Solución sin inóculo	18
Figura 4.3 a) Recolección del agua de mar, b) almacenamiento del agua de mar. ...	19
Figura 4.4 a) Operación de los reactores y b) reactores inoculados, c) reactor control sin inóculo	20
Figura 4.5 Muestras tomadas durante la cinética.....	21
Figura 4.6 Proceso de extracción líquido-líquido para las muestras recolectadas. ...	22
Figura 4.7 Extracción sólido-líquido para las muestras en fase sólida.	23
Figura 4.8 Conteo en placa de las UFC's para cada muestra recolectada.....	24
Figura 5.1 Crecimiento microbiano en las diferentes fracciones, líquido, sólido y sólido-líquido para el reactor 1 a 60 ppm (n=3).	26
Figura 5.2 Crecimiento microbiano en las diferentes fracciones, líquido, sólido y sólido-líquido para el reactor 2 a 60 ppm (n=3).	26
Figura 5.3 Porcentaje degradado total de fenantreno en la fracción sólido-líquido para el reactor 1 y 2 a 60 ppm.	27
Figura 5.4 Crecimiento microbiano en las diferentes fracciones, líquido, sólido y sólido-líquido para el reactor 1 a 200 ppm (n=3).....	28
Figura 5.5 Crecimiento microbiano en las diferentes fracciones, líquido, sólido y sólido-líquido para el reactor 2 a 200 ppm	28
Figura 5.6 Porcentaje degradado total de fenantreno en la fracción sólido-líquido para el reactor 1 y 2 a 200 ppm.	29

Figura 5.7 Crecimiento microbiano en las diferentes fracciones, líquido, sólido y sólido-líquido para el reactor 1 a 600 ppm (n=3).....	30
Figura 5.8 Crecimiento microbiano en las diferentes fracciones, líquido, sólido y sólido-líquido para el reactor 2 a 600 ppm (n=3).....	31
Figura 5.9 Porcentaje degradado total de fenantreno en la fracción sólido-líquido para el reactor 1 y 2 a 600 ppm.	32
Figura 5.10 Ajuste del crecimiento microbiano al modelo Gompertz para el reactor 1 a 60 ppm.	34
Figura 5.11 Ajuste del crecimiento microbiano al modelo Gompertz para el reactor 2 a 60 ppm.	35
Figura 5.12 Ajuste de la degradación de fenantreno al modelo Gompertz para el reactor 1 a 60 ppm.	37
Figura 5.13 Ajuste de la degradación al modelo Gompertz para el reactor 2 a 60 ppm.	38
Figura 5.14 Ajuste del crecimiento microbiano al modelo Gompertz para el reactor 1 a 200 ppm.	39
Figura 5.15 Ajuste del crecimiento microbiano al modelo Gompertz para el reactor 2 a 200 ppm.	40
Figura 5.16 Ajuste de la degradación al modelo Gompertz para el reactor 1 a 200 ppm	41
Figura 5.17 Ajuste de la degradación al modelo Gompertz para el reactor 2 a 200 ppm	42
Figura 5.18 Ajuste de la degradación al modelo Gompertz para el reactor 1 a 600 ppm	43
Figura 5.19 Ajuste de la degradación al modelo Gompertz para el reactor 2 a 600 ppm	44
Figura 5.20 Diferencia significativa utilizando el método de Fisher.....	45

Figura 5.21 Comparación entre los remanentes de fenantreno promedio de los reactores 1 y 2 para las pruebas a 60, 200 y 600 ppm.....	47
--	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1 Propiedades físicas y químicas de los HAP's prioritarios de acuerdo con la EPA	4
Tabla 5.1 Cálculo de parámetros del modelo Gompertz para el crecimiento microbiano a 60 ppm.	36
Tabla 5.2 Estimación de parámetros del modelo Gompertz para la degradación de fenantreno a 60 ppm.	37
Tabla 5.3 Cálculo de parámetros del modelo Gompertz para el crecimiento microbiano a 200 ppm.	39
Tabla 5.4 Estimación de parámetros del modelo Gompertz para la degradación de fenantreno a 200 ppm.	41

I. INTRODUCCIÓN

En México se ha dado un desarrollo en diversos sectores productivos. En el sector marítimo, se ha incrementado el movimiento de barcos de carga y cruceros, así como la actividad en plataformas petroleras. Algunos de los problemas relacionados con dicho incremento tiene como consecuencia derrames y fugas de hidrocarburos derivados del petróleo. De estos compuestos derivan los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's). La contaminación por hidrocarburos impactan directamente a la salud humana y la diversidad biológica (Miranda *et al.*, 2007). Entre los efectos nocivos se encuentran; interferencia en procesos celulares, interferencias en la búsqueda de alimento y carcinogénesis (Carrillo, 2009).

En los últimos años se han desarrollado nuevas tecnologías para resolver estos problemas de contaminación. Se ha demostrado que los microorganismos juegan un papel importante en la degradación de estos contaminantes. Existen microorganismos capaces de utilizar HAP's como única fuente de carbono y energía. Estos microorganismos se han utilizado exitosamente para la biodegradación de HAP's. Algunos autores recomiendan el uso de consorcios microbianos que la sola acción de uno para alcanzar la degradación efectiva de compuestos como HAP's (Sarkar *et al.*, 2013). Los consorcios microbianos son una forma más efectiva de conducir a la biodegradación de estos compuestos. El fenantreno además de ser considerado un contaminante prioritario entre los 16 que se enlistan en la *Environmental Protection Agency* (EPA), es usado para modelar la degradación de HAP's. Su estructura es similar al encontrado en muchos HAP's carcinógenos (Lu *et al.*, 2012).

Con base en una revisión de la bibliografía se han encontrado numerosas investigaciones sobre la degradación de HAP's por diferentes cepas, con capacidad de degradar estos compuestos. La mayoría de las investigaciones se han enfocado en la eficiencia de degradación. Entre las variables estudiadas se encuentra la degradación de mezcla de diversos HAP's o la degradación de HAP's específicos (García *et al.*, 2008). En otros estudios se han evaluado los efectos de la inoculación de una cepa sobre la composición bacteriana de un consorcio degradador de

fenantreno en cultivos discontinuos (*batch*) (Madueño *et al.*, 2009). También se ha evaluado la remoción de fenantreno y la evaluación del crecimiento del consorcio microbiano y la degradación en agua de mar con diferentes tratamientos (Poot, 2016). En estos estudios se demuestran que los cambios en el medio tienen efecto sobre el crecimiento de los microorganismos. Sin embargo aún existen variables sin estudiar, como la actividad metabólica, la concentración en el medio, los metabolitos que produce la degradación, entre otras. Lo anterior es importante para el diseño de biorreactores, en el control y diseño de las condiciones adecuadas para los microorganismos en los sistemas de tratamiento (García *et al.*, 2008; Rosales, 2008).

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de las concentraciones de fenantreno sobre el crecimiento de un consorcio bacteriano.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar la cinética de crecimiento del consorcio microbiano a diferentes concentraciones de fenantreno.
- Determinar la cinética de degradación del fenantreno para las condiciones del estudio.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Contaminación por Hidrocarburos Aromáticos

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) representan un grupo de compuestos químicos formados por dos o más anillos bencénicos fusionados en forma linear, angular o agrupada. Actualmente se conocen unos 100 tipos diferentes de HAP's, ya que existe una elevada cantidad de isómeros. La distribución espacial de electrones en los anillos aromáticos (resonancia) les proporciona una elevada estabilidad. Esta característica los hace resistentes a la oxidación tanto química como biológica. Debido a su amplia distribución, toxicidad y persistencia han sido considerados agentes contaminantes de gran interés. En 1979 la EPA incluyó los 16 HAP's de 2 a 6 anillos en su lista de contaminantes de investigación prioritaria (Figura 3.1). Estos representan un riesgo para la salud pública (Izquierdo, 2013).

Los HAP's pueden ser depositados al mar de manera natural a través de la lluvia o por efluentes municipales e industriales. De esta manera dañan el ambiente marino y según su composición y estructura puede encontrarse en el agua o sedimento de mar (Peng y Xuan, 2010). Las fuentes antropogénicas que emiten HAP's se pueden clasificar en fijas y móviles. Entre las fuentes fijas se encuentran instalaciones de generación de calor y energía, calefacción con carbón y madera, quemadores de gas, incineración de residuos orgánicos municipales e industriales, quemas intencionales, incendios forestales y diversos procesos industriales (coque, cracking del petróleo, fundidoras, producción de asfalto.). Las fuentes móviles son aquellas en dónde se queman combustibles fósiles utilizados en medios de transporte terrestre, marítimo y aéreo (Carrillo, 2009).

Los HAP's pueden encontrarse de manera natural en el petróleo o pueden ser el resultado de la combustión de materia orgánica que contine carbón e hidrógeno. Según su estructura se pueden clasificar como de bajo y alto peso molecular; los de alto peso molecular son aquellos que tienen dos o tres anillos como el naftaleno y el fenantreno, que son menos hidrofóbicos y con alta toxicidad. Los de alto peso molecular contienen en su estructura más de tres anillos. Éstos son fuertemente

hidrofóbicos, mutagénicos y carcinógenicos (Vera *et al.*, 2002). En la Tabla 3.1 se presentan algunos HAP's de mayor prioridad para la EPA.

Tabla 3.1 Propiedades físicas y químicas de los HAP's prioritarios de acuerdo con la EPA

Componente	No. de átomos	Peso Molecular	Solubilidad en agua a 25°C (µg/L)	Presión de vapor (Pa a 25°C)	Punto de Ebullición	Densidad
Naftaleno	10	128.2	3.17×10^4	10.4	218	1.154
Fenantreno	14	178.2	1.29×10^3	1.6×10^{-2}	340	0.98
Antraceno	14	178.2	73	8.0×10^{-4}	342	1.283
Pireno	16	202.3	135	6×10^{-4}	393	1.271
Fluoranteno	16	202.3	260	1.2×10^{-3}	375	1.252
Chriseno	18	228.3	2	8.4×10^{-5}	448	1.274
Benzo(a)pireno	20	252.3	3.8	7.3×10^{-7}	496	1.351

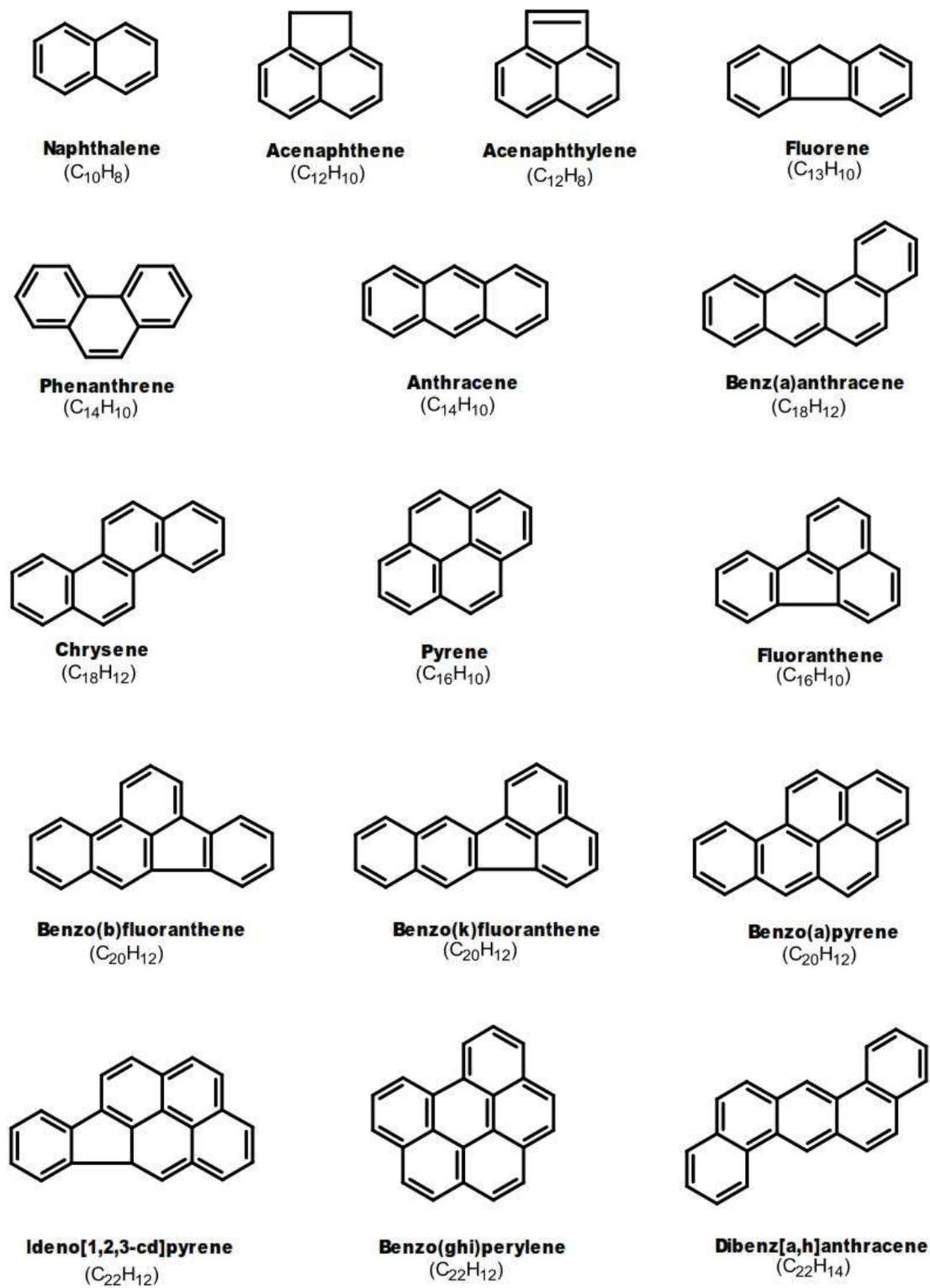


Figura 3.1 Estructura química de los HAP's prioritarios de acuerdo con la EPA

Los anillos de benceno de los HAP's poseen electrones que reducen la polaridad de los enlaces dentro de la molécula. En contraste con las moléculas que poseen electrones localizados. Lo que confiere una mayor estabilidad química y los hace más resistentes al ataque nucleófilo y a la ruptura.

Los HAP's tienen algunas características que son similares a los de otros contaminantes orgánicos persistentes. Las similitudes incluyen una naturaleza hidrófoba y lipófila, baja solubilidad en agua y baja volatilidad. Además tienen la tendencia a bioacumularse en organismos acuáticos que son susceptibles a estos compuestos (Koch, 2011).

Estas características de los HAP's dificultan su remoción en agua y sitios contaminados. Es necesario aplicar nuevas tecnologías para su tratamiento, que sean más efectivos y no dañinos para el ambiente.

3.1.1 Fenantreno

El fenantreno es uno de los hidrocarburos más frecuentes en el ambiente, clasificado por la EPA como un contaminante prioritario que contribuye con más del 49% del total de HAP's en el ambiente. Es considerado junto con el fluoranteno y pireno, como los principales hidrocarburos contaminantes.

El fenantreno es un HAP's de tres anillos, es moderadamente tóxico. Puede entrar al cuerpo por ingestión, inhalación o absorción de la piel. Es conocido como un fotosensibilizador de la piel humana, es un alérgeno leve y es mutagénico al sistema microbiano humano (Xiang *et al.*, 2006). Generalmente se encuentra en suelos contaminados, incluso en suelos intemperizados, esto puede atribuirse a que se adsorbe rápidamente en ciertos tipos de suelos, lo cual afecta su disponibilidad para los microorganismos.

Es usado para el estudio en la biodegradación de los HAP's que numerosas bacterias utilizan como única fuente de carbono y energía. Debido a que el fenantreno contiene una región-bahía y una región-K, presenta el mismo tipo de arreglo que otros HAP's (Figura 3.2). Además, es un compuesto útil para el estudio del metabolismo de HAP's

cancerígenos como el benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno y el criseno, debido a su bajo peso molecular y número de anillos (Koch, 2011 y Viñas, 2005).

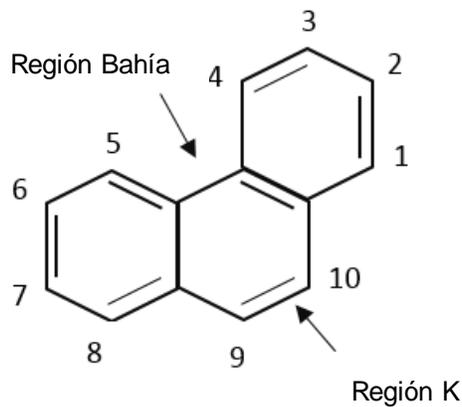


Figura 3.2. Estructura molecular del fenantreno

3.2 Uso de microorganismos en la biorremediación

La biodegradación ha empezado a ser un área de investigación cada vez más utilizada en el desarrollo de técnicas de biodegradación microbiana. Es uno de los métodos más prometedores para remover los HAP's de sitios contaminados. Entre las variables a considerar, la concentración del contaminante es crucial para la selección de los organismos que serán utilizados en la biorremediación (Li *et al.*, 2012).

Los sitios contaminados son la fuente primaria de consorcios microbianos degradadores de contaminantes como los HAP's. Los microorganismos presentes en estos sitios pueden ser seleccionados para tratamientos a nivel laboratorio a través de factores ambientales adecuados (Moliterni *et al.*, 2012). El análisis de la diversidad bacteriana en un consorcio es esencial para aclarar el papel de los miembros del consorcio en el proceso de biodegradación. Lo anterior es útil, ya que contribuye a entender los cambios de los microorganismos bajo diferentes presiones ambientales (Ma *et al.*, 2015). En el medio ambiente las condiciones son inestables y la concentración de contaminantes como los HAP's varía. La acumulación de metabolitos

tóxicos es un fenómeno común observado en la degradación de HAP's. En el laboratorio los cultivos puros son afectados por metabolitos tóxicos que pueden inhibir el crecimiento (Mehdi *et al.*, 2012 y Madueño *et al.*, 2009).

La variación del sustrato tiene un importante efecto en los microorganismos y es caracterizada por la condición de estrés para el microorganismo. En un estudio (Moreno *et al.*, 2008) se evaluó la variación de la concentración de 4-clorofenol en un reactor *batch* de lecho fluidizado. La capacidad de degradación y la biomasa presente en el lecho fluidizado fueron evaluadas. Aunque el lecho fluidizado mostró gran robustez, se observó un efecto negativo en la degradación. Las descargas de contaminante variaron, por lo que la aclimatación de los microorganismos en la biodegradación se hizo en primera instancia, sin embargo la aclimatación no fue permanente. La pérdida de la degradación microbiana fue atribuida a la disminución tanto en la actividad enzimática como en la viabilidad de células suspendidas. Se concluyó que un incremento en la concentración de sustratos inhibidores produce una inhibición de los microorganismos, reflejado en la eficiencia con respecto a la remoción de contaminantes tóxicos.

En la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Yucatán se han llevado a cabo estudios de degradación de fenantreno por microorganismos. En un estudio, se realizó el aislamiento de un consorcio microbiano degradador de fenantreno (Gutiérrez, 2014) proveniente del puerto de Telchac, Yucatán. Se identificaron las cepas integradoras del consorcio y se evaluó la eficiencia de remoción del fenantreno de dichas cepas. Se concluyó que los microorganismos aislados fueron capaces de utilizar el fenantreno como única fuente de carbono y energía y se valuó la eficiencia de degradación. En otro estudio, se utilizó un reactor de lecho fluidizado (Fernández, 2014) y se estudió el efecto del flujo de aire suministrado al reactor sobre el crecimiento del consorcio degradador de fenantreno. El proceso de la cinética se llevó a cabo utilizando diferentes flujos de aire. Los resultados indicaron que el flujo más adecuado para la formación de la biopelícula en el carbón fue de 2 l/min. También se ha evaluado el crecimiento del consorcio microbiano y la degradación del fenantreno en agua de mar con diferentes tratamientos. En este estudio se concluyó que la mejor condición fue agua de mar natural sin esterilizar (Poot, 2016).

El crecimiento de los microorganismos en los tratamientos de biodegradación, requieren del monitoreo de factores como; el pH, la concentración del contaminante, temperatura, presencia de nutrientes, composición microbiana, agitación, aireación, entre otros. Todos estos factores son evaluados para mejorar el proceso de biodegradación y establecer condiciones optimas para un tratamiento exitoso (Xiang *et al.*, 2006).

3.3 Biorreactores

Un biorreactor es un sistema que mantiene el ambiente biológicamente activo. Se considera como parte principal en sistemas microbianos. La función principal de un biorreactor es la de proveer un medio controlado para alcanzar el crecimiento y la formación de productos. Dentro de los reactores se encuentran los reactores de lecho fijo y de lecho móvil. En el primero la retención de la biomasa se logra utilizando un material de relleno inmóvil, sobre el cual se adhieren los microorganismos. En el segundo los microorganismos son inmovilizados sobre un soporte granular suspendido por una corriente de líquido.

3.3.1 Biorreactores de lecho móvil

El reactor de lecho móvil está compuesto por partículas sólidas y una fase líquida. A medida que el flujo de aire se incrementa las partículas son elevadas levemente y dejan de estar en permanente contacto unas con otras. En este tipo de reactores se logra un mejor contacto entre la fase sólida y líquida. Los sistemas que involucran microorganismos en suspensión tienen una mayor eficiencia. Es una tecnología con ventajas operativas y de bajo costo (Barwal y Chaudhary, 2014).

Las principales ventajas de la fluidización consisten en que el sólido está vigorosamente agitado por el fluido que circula a través del lecho. La mezcla de los sólidos asegura que no existen gradientes de temperatura en el lecho aun con reacciones fuertemente exotérmicas o endotérmicas. Los reactores de lecho móvil

presentan una mezcla más uniforme que el reactor de lecho fijo. Los gradientes de concentración axial y radial disminuyen permitiendo un mejor contacto entre el líquido y sólido. Lo anterior mejora la eficiencia en los procesos de degradación (Flores *et al.*, 2007).

También se ha demostrado que los reactores de lecho móvil mejoran el crecimiento en la interfase orgánica-acuosa. Estos reactores favorecen la viabilidad de la célula y la selección de organismos degradadores. Representan una opción para el tratamiento de mezclas de HAP's porque previenen la dispersión estos compuestos. Estos reactores son usados para la degradación de contaminantes poco solubles. Los reactores de lecho móvil mejoran la biodisponibilidad del contaminante aumentando las velocidades de transferencia de masa en la fase acuosa (Guieysse *et al.*, 2001).

3.3.2 Formación de la biopelícula en el soporte

Cuando las comunidades de microorganismos crecen en una superficie, son llamadas biopelículas. El biosoporte transporta al microorganismo a través del reactor. La biopelícula crece protegido dentro de la superficie del biosoporte. Por lo anterior el área es un parámetro de diseño. La biopelícula que crece dentro de las estructuras internas de los biosoportes, degrada los contaminantes disueltos en la corriente de agua. Cada biopelícula es transportada a través de un área de superficie activa manteniendo a las bacterias protegidas. Se requiere el desarrollo de una capa muy fina, distribuida uniformemente y una suave biopelícula para permitir el transporte de sustrato y oxígeno a la superficie de la biopelícula. El transporte del sustrato a las células es esencial para mantener la película viable para el tratamiento.

En un estudio realizado (Fernández, 2014) se evaluaron las condiciones de operación, variando el flujo de aire. Se determinó la mejor condición de flujo de aire suministrado al reactor de lecho móvil. Con este flujo de aire se observó un máximo crecimiento bacteriano. Los microorganismos crecieron en la superficie del carbón formando una biopelícula. Los resultados obtenidos comprueban que la turbulencia debe ser adecuada para permitir la formación de la biopelícula.

La turbulencia adecuada también mantiene la velocidad de flujo necesaria para que el sistema actúe eficazmente. Una turbulencia extremadamente alta provoca el desprendimiento de la biopelícula. La colisión constante del medio y el cizallamiento en el proceso impide el crecimiento de la biopelícula en el medio. La diferencia entre el crecimiento de la biopelícula, su fijación y el desprendimiento, definen su desarrollo y son influenciados por varios procesos incluyendo la adsorción, la desorción de los microorganismos en la superficie del sólido, así como el espesor y la adhesión (Barwal y Chaudhary, 2014).

3.4 Crecimiento microbiano

El crecimiento microbiano se ha descrito también por una variedad de modelos matemáticos. Una curva de crecimiento microbiano ideal es un gráfico del número de células vivas como una función del tiempo. La curva real de crecimiento microbiano es un registro de las células contables, determinadas en ciertos intervalos de tiempo durante la evolución de la población.

El crecimiento es el aumento del número de individuos en la población debido al incremento ordenado de todos los constituyentes químicos de un organismo. La curva de crecimiento de un microorganismo se puede dividir en cuatro fases distintas: fase de latencia (lag), fase exponencial (log), fase estacionario y fase de muerte. La fase de latencia es el periodo en que las células se adaptan a un medio de cultivo antes de iniciar su crecimiento. En la fase exponencial o logarítmica los microorganismos crecen y se dividen hasta un número máximo. Este crecimiento está en función del medio, de las condiciones de crecimiento y el potencial genético. En este periodo hay una relación lineal entre el logaritmo del número de células y el tiempo de incubación. La fase estacionaria es donde se presenta la disminución de la velocidad de crecimiento, como resultado de la disminución de los nutrientes disponibles o el efecto de la acumulación de productos tóxicos del metabolismo. Por último, la fase de muerte es una consecuencia de diversos factores que afectan el crecimiento. El más importante es el agotamiento de las reservas de energía por parte de las células microbianas. Esta fase también tiene una relación lineal de las células viables, que van decreciendo,

conforme transcurre el tiempo. En la Figura 3.3 se observan las diferentes etapas del crecimiento microbiano.

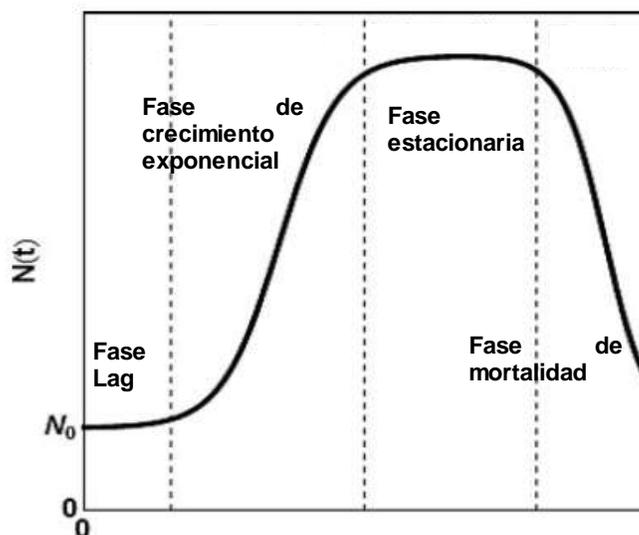


Figura 3.3. Curva característica de crecimiento microbiano

Las células microbianas requieren un alto grado de adaptabilidad para responder a cambios en el medio físico como en el químico. En el proceso de crecimiento existen varios factores para la adaptación del microorganismo como es el caso de la composición del medio o del estado fisiológico de la cepa. Lo anterior influye en la cinética de los microorganismos. Las respuestas de los microorganismos a estos cambios se ven reflejadas en los parámetros de crecimiento como: el tiempo de latencia, el tiempo de generación, la velocidad de crecimiento y el máximo valor de crecimiento alcanzado.

El estudio de la cinética en los procesos de biodegradación es esencial para conocer la eficiencia de un proceso biológico, conocer los efectos inhibitorios de su actividad y de esta manera poder diseñar los biorreactores de manera adecuada tanto a nivel laboratorio como a mayor escala (Puyol, 2010; López *et al.*, 2008).

La cinética de biodegradación es esencial en el diseño y control de procesos. En el estudio realizado por Lu *et al.*, (2012) el objetivo fue identificar los metabolitos involucrados en la degradación del fenantreno, se investigó su cinética a diferentes concentraciones iniciales y las constantes de inhibición. La cinética de degradación de fenantreno fue evaluada a intervalos de concentraciones del contaminante. Se encontró que la presencia de algunos metabolitos que se producen en el proceso de degradación como el hidroxy-2-ácido naftóico, son compuestos tóxicos e inhiben el metabolismo. En el análisis cinético, la velocidad específica de degradación se dividió en dos partes, una donde la velocidad específica de degradación inicial incrementa gradualmente con el incremento de la concentración y otra a concentraciones por encima de ésta donde se observan efectos inhibitorios. Se concluye que el estudio de la cinética proporciona información sobre los alcances y limitaciones del proceso de degradación, así mismo son la base para estudios comparativos o de selección de cepas y contaminantes, para modelar la cinética y predecir resultados.

3.5 Modelos de crecimiento bacteriano

Existen modelos matemáticos desarrollados para predecir el comportamiento de las poblaciones bacterianas en condiciones controladas de laboratorio. Estos modelos matemáticos ayudan a describir el comportamiento microbiano afectado por factores del medio. La expresión común del tamaño de la población está en la forma de "unidades formadoras de colonias" (UFC). Una vez determinada, la relación experimental entre el recuento real $N(t)$, la relación de crecimiento $N(t)/N$ ó su logaritmo y el tiempo, es ajustado a un modelo de crecimiento matemático conocido como el "modelo primario" (Peleg y Corradini, 2011). Un gran número de funciones matemáticas se han diseñado para describir el crecimiento, entre ellas el modelo Gompertz.

3.5.1 Modelo de crecimiento Gompertz

Entre los modelos de crecimiento empíricos, el más destacado y ampliamente utilizado es el modelo Gompertz, es una herramienta muy flexible y por lo tanto su uso generalizado en muchas disciplinas. Mediante el ajuste de sus parámetros, el modelo de Gompertz puede describir curvas de crecimiento que tienen un largo o corto "tiempo lag" o ninguno.

El modelo Gompertz asume que la tasa de crecimiento se incrementa hasta alcanzar un máximo y después decrece en forma asintótica. La curva de crecimiento es una sigmoideal, con un punto de inflexión y una asíntota. El punto de inflexión corresponde a la máxima tasa de crecimiento alcanzada.

En la fase inicial de la curva se observa un periodo donde la tasa de crecimiento es cercana a 0. Lo anterior se denomina fase Lag. Esta fase se describe como el tiempo en el que se presenta la maduración y está limitada por la línea tangente al punto de inflexión que corta el eje X (Casas *et al.*, 2010). El modelo Gompertz se basa originalmente en los cambios en la tasa de crecimiento en lugar del número real y no proporciona ninguna explicación de lo que causa el aumento exponencial de la población, es decir, lo que desencadena su inicio y la causa por la que se ralentiza cuando se alcanza un cierto tamaño (Peleg y Corradini, 2011). El modelo Gompertz se puede escribir de la siguiente forma.

$$y = a * e^{e^{-b(-c*t)}} \quad [1]$$

Donde

a: concentración máxima disipada (asintótica) cuando $t \rightarrow \infty$

b: Constante de integración

c: Pendiente de la curva

x: Tiempo (en días)

IV METODOLOGÍA

4.1 Diagrama general de la metodología

El trabajo experimental y analítico se llevó a cabo en tres etapas. En la primera etapa se hicieron las pruebas preliminares. Estas pruebas comprenden la activación del carbón por el método químico (Fernández, 2014), la recolección, la esterilización del agua de mar para los reactores y la incubación del consorcio.

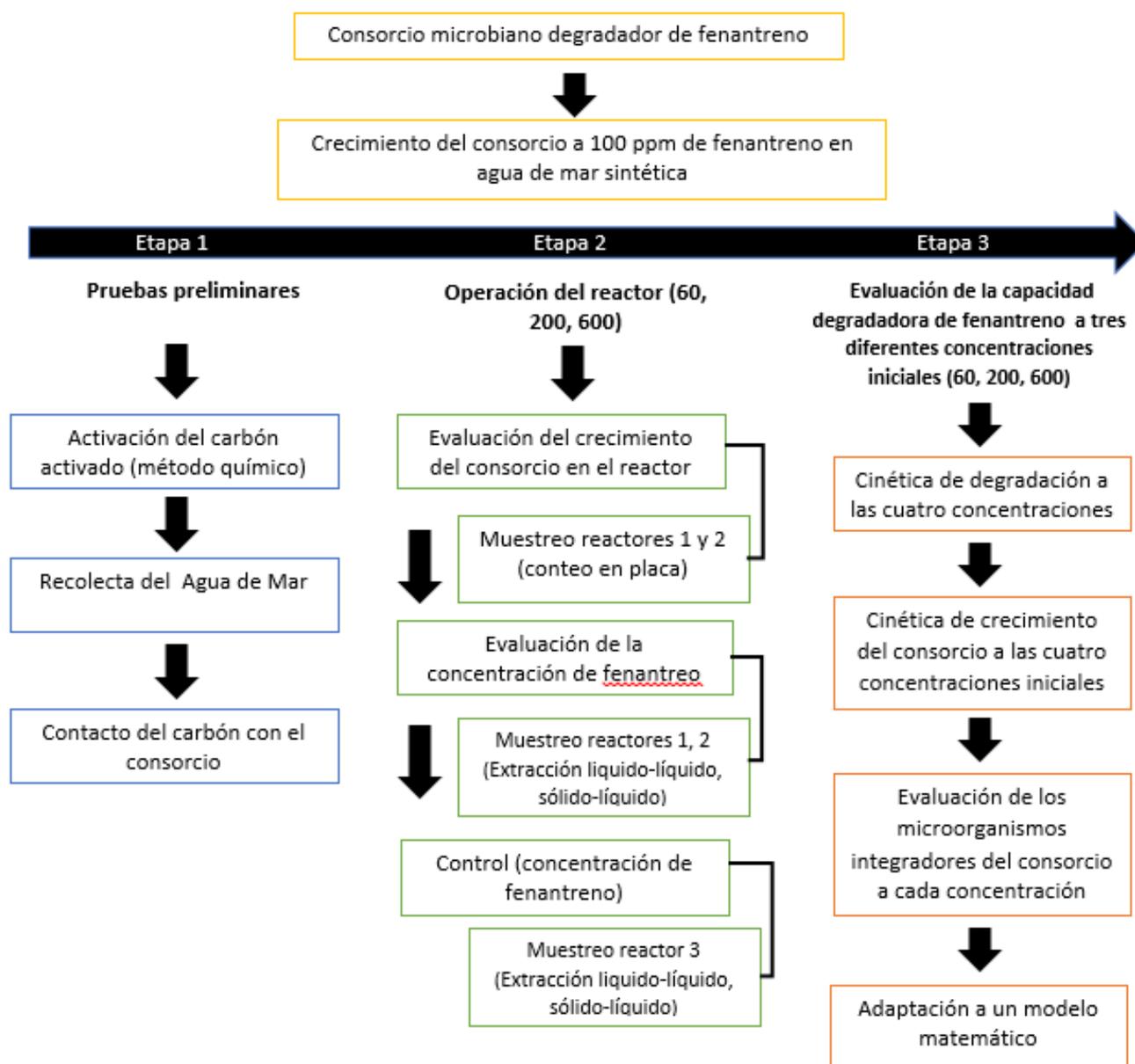


Figura 4.1 Esquema general de trabajo

En la etapa dos, se llevó a cabo la operación y muestreo del reactor, se hizo una extracción de la fase sólida (carbón) y líquida y se monitoreó el crecimiento microbiano. Finalmente en la etapa tres, se hizo un análisis de los resultados. En la Figura 4.1 se presenta un diagrama general de trabajo.

4.2 Pruebas preliminares

Se llevaron a cabo pruebas preliminares que consistieron en la preparación de los materiales y reactivos para la puesta en marcha del reactor. En esta etapa se seleccionó el método químico para la activación del carbón y se llevó a cabo el crecimiento del consorcio. También en esta etapa se cambiaron difusores de aire, y empaques para el funcionamiento adecuado del reactor.

4.2.1 Crecimiento del consorcio

El crecimiento del consorcio se llevó a cabo en matraces de 500 ml. Para obtener en el medio de crecimiento una concentración final fue de 100 ppm de fenantreno, éste fue añadido tomando 3 ml de una solución concentrada de 10000 ppm en acetona. La acetona fue evaporada con una bomba de aire con filtro para mantener las condiciones estériles. Después se añadieron 250 ml de agua de mar sintética conteniendo por litro: 24.5 g de NaCl, 11.1 g de MgCl₂, 4.1 g de Na₂SO₄, 1.54 g de CaCl₂, 0.7 g de KCl, 200 mg de NaHCO₃, 100 de KBr, 30 mg de H₃BO₄, 20 mg de SrCl₂ y 3 mg de NaF. Finalmente se añadieron 50 ml del consorcio en cada matraz y se incubaron en agitación a 150 rpm a temperatura ambiente. Este procedimiento se repitió cada 8 días.

4.2.2 Activación del carbón

El medio de soporte para el crecimiento bacteriano que se usó en la reactor fue el carbón tipo *pellet*, debido a que presentan mejores características como soporte microbiano (Fernández, 2014). El carbón fue de 4 mm de diámetro microporoso. La activación se llevó a cabo con la finalidad de aumentar la porosidad del mismo, para mayor área superficial y favorecer al crecimiento de bacterias en el carbón.

El procedimiento se llevó a cabo con el método químico. Se pesaron 100 g de carbón tipo *pellet* y se llevó a cabo una serie de lavados, primero con agua de la llave y después con agua destilada varias veces hasta que el agua no presentó color. Después el carbón fue puesto en contacto con 300 ml de HCl concentrado y se mantuvo en agitación por 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo se lavó con agua destilada y se llevó a cabo la etapa de secado. Se colocó en la estufa a una temperatura de 110 °C por ocho horas y después en capsulas de porcelana se dejó en la mufla a una temperatura de 350 °C por dos horas y finalmente fue almacenado.

4.2.3 Contacto del carbón con el consorcio microbiano

Cuando se obtuvo el volumen de 1 litro del consorcio, para cada reactor, se le agregaron 100 g de carbón activado. Para permitir el contacto de los microorganismos con la superficie porosa del carbón (fase móvil) esta solución se mantuvo en agitación durante 24 horas. Trascurrido este tiempo, el fenantreno fue disuelto en acetona y añadido al medio para obtener la concentración final deseada. Después, se agitó a 150 rpm durante otras 24 horas (Fernández, 2014). Este procedimiento se realizó a las tres concentraciones de fenantreno que fueron evaluadas, a 60, 200 y 600 ppm. A la par se preparó un litro de agua de mar sintética, posteriormente se añadieron 100 g de carbón activado, se agregó fenantreno y se mantuvo en agitación por 24 horas a 150 ppm. Este litro de solución fue preparado para utilizar en el reactor de control en cada prueba.



Figura 4.2 a) y b) Solución de agua de mar y fenantreno y carbón con inóculo, c) Solución sin inóculo

4.2.4 Recolección del agua de mar y tratamiento

Para los reactores se utilizó agua de mar natural estéril. El agua fue recolectada en el muelle del puerto de Telchac, Yucatán en botellas de 4 litros color ámbar. Las botellas se sellaron con papel *parafilm* y fueron colocadas en una nevera con hielo para su traslado al laboratorio (Figura 4.3 a). En total para cada prueba se recolectaron 24 litros. En el laboratorio se procedió a filtrar el agua de mar con papel filtro para remover arenas e impurezas. Una vez filtrados los 24 litros de agua se esterilizaron a 121 °C por 15 min en autoclave para eliminar los microorganismos presentes en la misma. Finalmente las botellas fueron almacenadas a 4°C en el cuarto frío para su posterior uso en el llenado de los reactores (Figura 4.3 b).

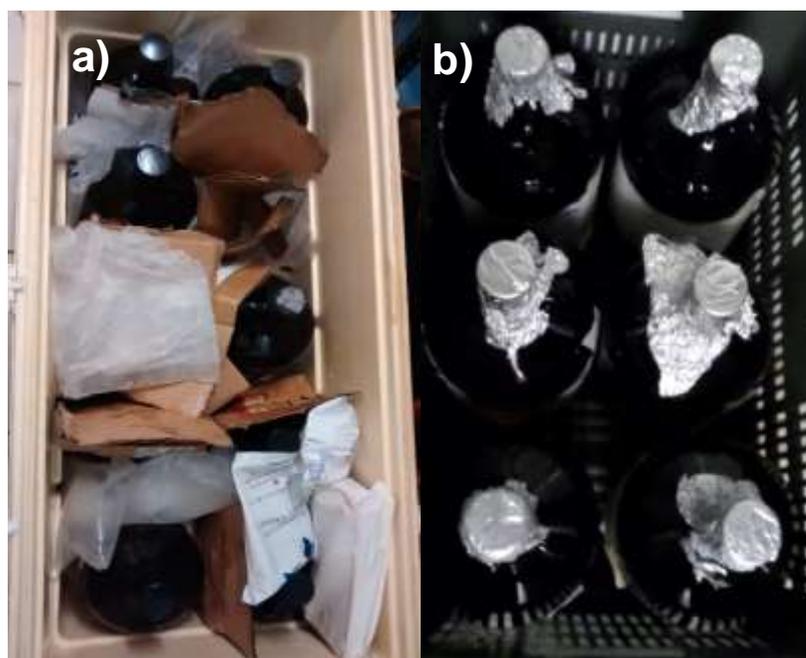


Figura 4.3 a) Recolección del agua de mar,
b) almacenamiento del agua de mar.

4.3 Operación del reactor

Tres recipientes cilíndricos de acrílico con capacidad de 7 litros fueron usados como biorreactores para el experimento. Cada uno con altura de 96 cm y 10 cm de diámetro. En el interior de cada reactor se colocó un tubo cilíndrico de 5 cm de diámetro y 80 cm de altura, el cual constaba de ventosas a los extremos para que sea sujetado a la pared del tubo exterior. Se cambiaron piezas y los aireadores para asegurar su buen funcionamiento. Los reactores fueron operados de modo *batch* con una fase acuosa y otra fase móvil. Los reactores fueron cerrados con tapas y se colocaron trampas de vapor en la parte superior. Para la aireación se utilizó una bomba para suministrar aire, el cual se hizo pasar por filtros estériles hacia los difusores encontrados en la parte inferior de los reactores. El flujo de aire se estableció a 2 ml/min con un medidor y se

controló durante la prueba de modo manual. El experimento se llevó a cabo a temperatura ambiente.

4.3.1 Alimentación al reactor

De los tres reactores, dos de ellos fueron llenados con 6 litros de agua de mar natural estéril y una solución de 1 litro preparada anteriormente con el inóculo, el fenantreno y 100 g de carbón activado cada uno. El tercer reactor fue usado como control de la prueba, para evaluar las pérdidas del contaminante. Fue llenado con 6 litros de agua de mar natural estéril y 1 litro de una solución preparada de agua de mar sintética sin el inóculo, el carbón activado, y fenantreno. El volumen final de cada reactor fue de 7 litros y para cada prueba (60, 200 y 600 ppm) se evaluaron dos reactores inoculados y un reactor de control.

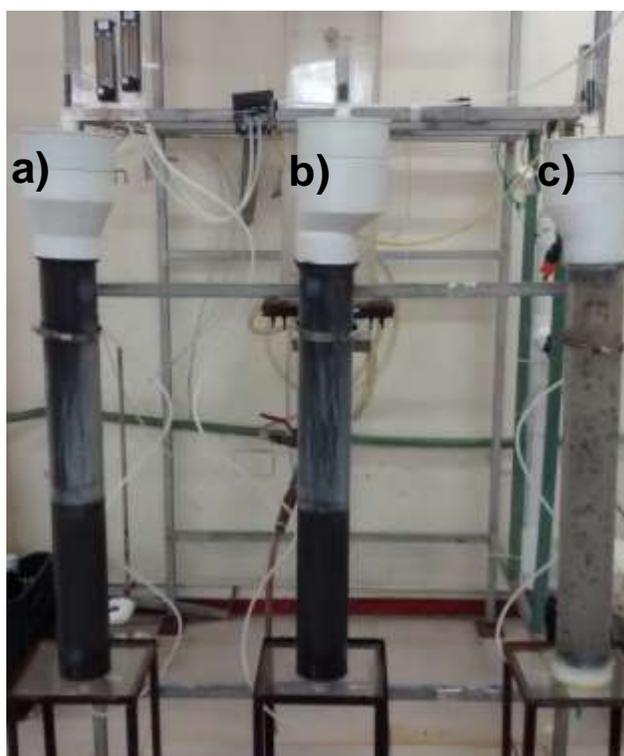


Figura 4.4 Operación de los reactores; a) y b) reactores inoculados, c) reactor control sin inóculo.

4.3.2 Muestreo y análisis de las muestras

Para el muestreo de cada reactor se tomaron alícuotas de 30 ml periódicamente durante 15 días en cada reactor. Para los dos reactores que contenían el inóculo se tomaron estas alícuotas alternadamente hasta el día 15. Las muestras para el reactor que se utilizó como control fueron tomadas cada hora durante las primeras 5 horas, se tomó una a los 7 días y una al finalizar la prueba. La concentración de fenantreno en las muestras fue determinada por extracciones en la fase líquida, y en el carbón con extracciones en líquido y sólido respectivamente. El crecimiento bacteriano se monitoreó del líquido y del carbón con un conteo en placa. Cada prueba se realizó por triplicado.

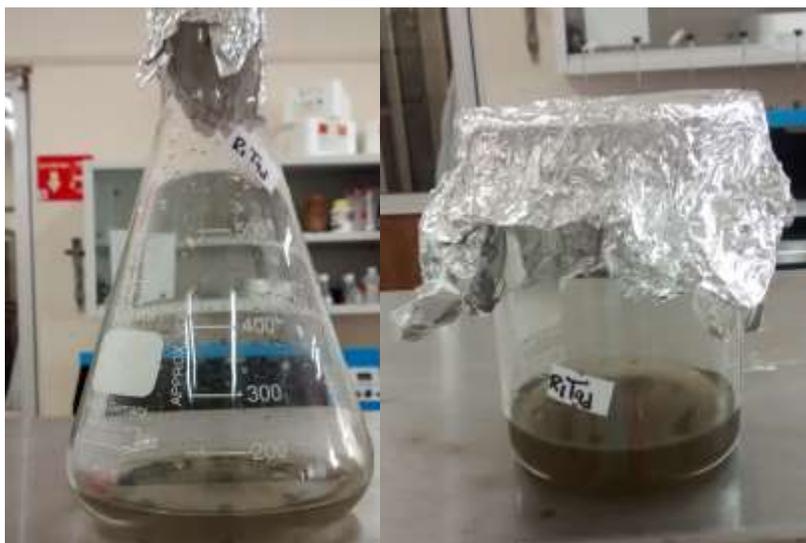


Figura 4.5 Muestras tomadas durante la cinética

4.3.3 Proceso de extracción líquido-líquido

En esta operación se llevó a cabo la transferencia de masa basada en la disolución del fenantreno en el diclorometano que fue usado como solvente selectivo, el cual es inmiscible con la fase líquida que contiene el soluto. Para cada muestra se tomaron 20 ml y se filtraron usando papel filtro. El filtrado se colocó en embudos de separación de

250 ml. Posteriormente, se añadieron 15 ml de diclorometano grado HPLC en 3 etapas (5 ml en cada una) al filtrado. Después se agitó el embudo con el fritado para el contacto con la muestra y separar las fases. Transcurrido 10 min se procedió a recolectar la fase orgánica en embudos de 50 ml. El extracto se evaporó en el rota-vapor, quedando en el matraz el fenantreno. La muestra se reconstituyó con 1 ml de acetonitrilo grado HPL y se colocó en viales para su posterior análisis cromatográfico (EPA 6610).



Figura 4.6 Proceso de extracción líquido-líquido para las muestras recolectadas.

4.3.4 Proceso de extracción sólido-líquido

Una vez filtrada la muestra, lo que quedó en el papel filtro y el carbón retenido, se colocó en tubos de teflón. Se añadieron 25 ml de una solución hexano-acetona 1:1 a cada tubo. Se cargó el método en el equipo CEM Mars (Microwave Reactor Accelerated Reaction System), usando una rampa de temperatura 80°C por 10 min y a 115 °C por 15 min. Lo anterior es debido a que la solubilidad del fenantreno aumenta con la temperatura y esto ocasiona una mayor velocidad de extracción. Además el coeficiente de difusión aumenta al elevarse la temperatura mejorándose la velocidad. Una vez terminada la extracción se filtraron las muestras con lana de vidrio y se colocaron en matraces de 50 ml. Las muestras contenidas en estos matraces se evaporaron en el rota-vapor y se reconstituyeron con 1 ml de acetonitrilo HPLC.

Finalmente se colocaron en viales para su posterior análisis en el cromatógrafo (EPA 3546).

En el análisis del cromatógrafo (Trace GC Ultra-ITQ-900), se empleó la columna capilar TG-SQC (30 m de longitud, I.D. 0.25 mm, Film 0.25 μm) con temperatura de inyección de 250 °C, detector 270°C y línea de transferencia 270 °C. La rampa utilizada en el horno fue de una temperatura inicial de 50 °C durante 1 minuto, con incrementos de temperatura de 15 °C/min hasta 225 °C. Se llevó la temperatura a 300 °C con un incremento de 30 °C/min y se mantuvo a esta temperatura durante 1 minuto. Finalmente se inyectó 1 μl de la muestra en modo *splitless* utilizando helio como gas acarreador con un flujo de 1 ml/min.



Figura 4.7 Extracción sólido-líquido para las muestras en fase sólida.

4.3.5 Conteo de poblaciones microbianas

De cada muestra se tomó una alícuota de 1 ml y se colocó en una solución isotónica. Se procedió a hacer diluciones y se colocaron 100 μ l de esta solución en cajas Petri con medio de cultivo agar TSA. Con ayuda de un asa de vidrio se expandió la muestra en el medio. Esto se repitió para cada una de las diluciones por triplicado manteniendo las condiciones estériles.

Para la cuantificación de microorganismos en la fase móvil del reactor, tomando el carbón de cada muestra y se colocó en una solución isotónica. Después se agitó con el *vortex* por 3 minutos y se tomó un mililitro para hacer diluciones. A continuación se colocaron 100 μ l de cada dilución en cajas Petri con agar TSA. Finalmente las muestras fueron incubadas a 37 °C. A las 24 y 48 horas se hizo el conteo en placa para cada una de las muestras tomadas en el carbón y en el líquido por triplicado.



Figura 4.8 Conteo en placa de las UFC's para cada muestra recolectada.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados de los experimentos realizados para determinar el comportamiento del consorcio bajo diferentes concentraciones de fenantreno. Se midió la concentración de fenantreno en el medio y las unidades formadoras de colonias (UFC). Se evaluó el crecimiento y la degradación durante un periodo de 15 días. Las cinéticas se llevaron a cabo por duplicado en paralelo, en los reactores uno y dos. El control de cada prueba fue evaluado en un tercer reactor sin el consorcio microbiano. Los análisis de las muestras tomadas de cada reactor, se hicieron por triplicado.

5.1 Validación del método cromatográfico

La idoneidad del sistema se evaluó a través del análisis de exactitud. La exactitud de este método fue evaluada con estudios de recuperación por una solución estándar de fenantreno en acetonitrilo y por sextuplicado. Después, se compararon las concentraciones obtenidas en las muestras. El Límite de Cuantificación (LC) representa la concentración más baja del análisis en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables, mientras que el Límite de Detección (LD) representa la concentración más baja de análisis en una muestra. La recuperación de fenantreno fue de $95.6 \pm 6 \%$ y el LC fue de 30.73 y el LD de 22.38 ppm.

5.2 Efecto del fenantreno a 60 ppm sobre el consorcio microbiano

Los resultados obtenidos de la prueba de crecimiento microbiano a la concentración de 60 ppm se observan en las Figuras 5.1 y 5.2 para el primer y segundo reactor respectivamente. Con respecto al crecimiento microbiano se observa que los microorganismos fueron creciendo en el medio, esto indica que fueron capaces de utilizar el fenantreno como única fuente de carbono en la solución.

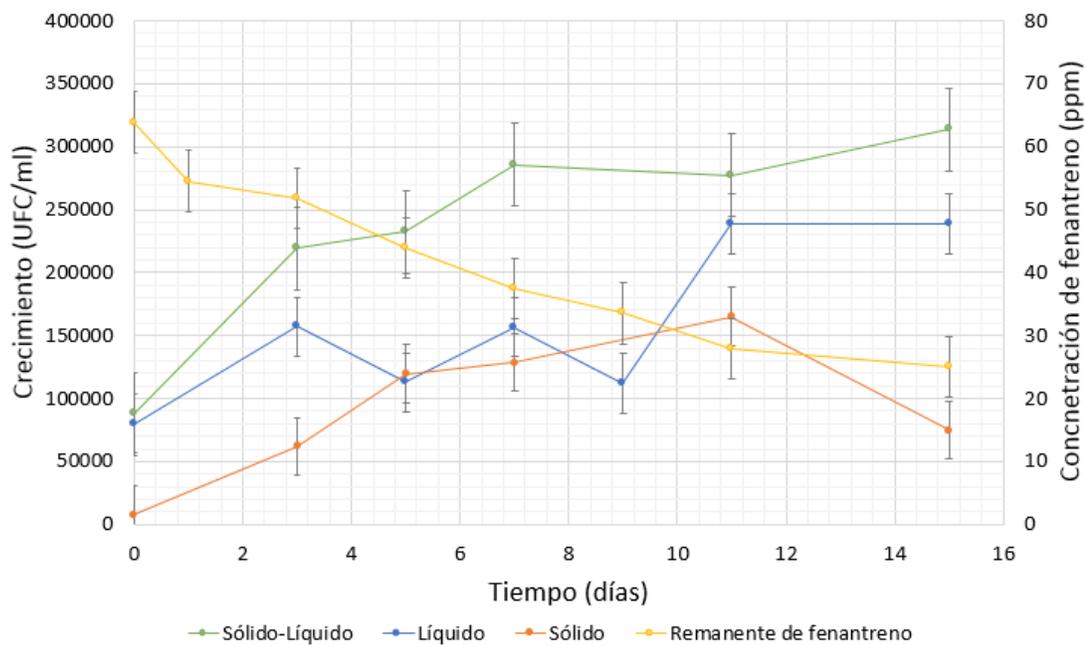


Figura 5.1 Crecimiento microbiano en las diferentes fracciones, líquido, sólido y sólido-líquido para el reactor 1 a 60 ppm (n=3).

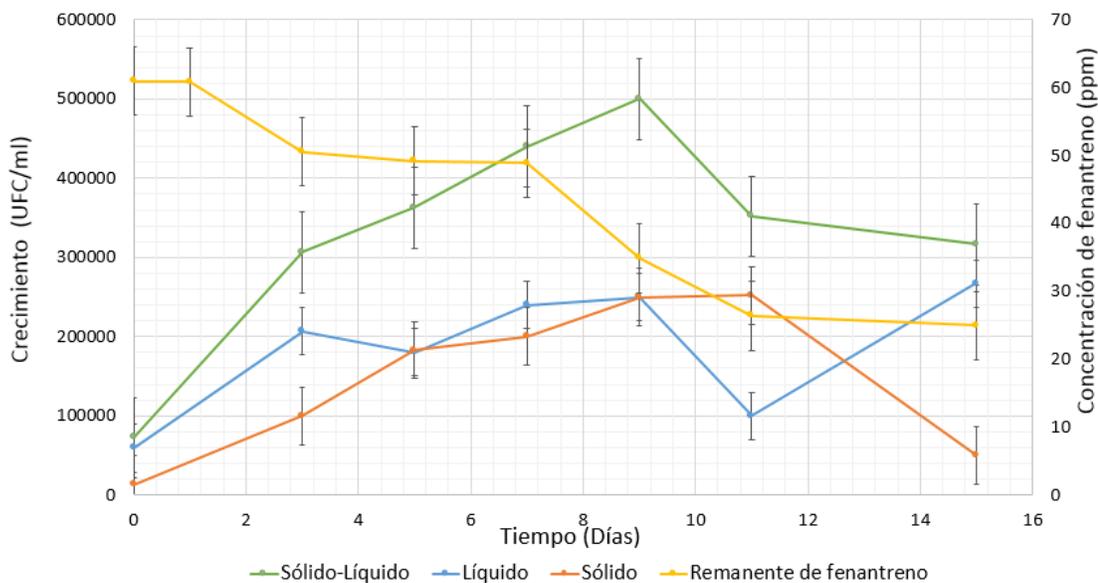


Figura 5.2 Crecimiento microbiano en las diferentes fracciones, líquido, sólido y sólido-líquido para el reactor 2 a 60 ppm (n=3).

El crecimiento total, en ambas fases fue de $8.76E4$ y $7.23E4$ UFC/ml hasta $3.13E5$ y $3.17E5$ UFC/ml para el primer y segundo reactor respectivamente. A partir del día 7 el crecimiento se mantuvo constante.

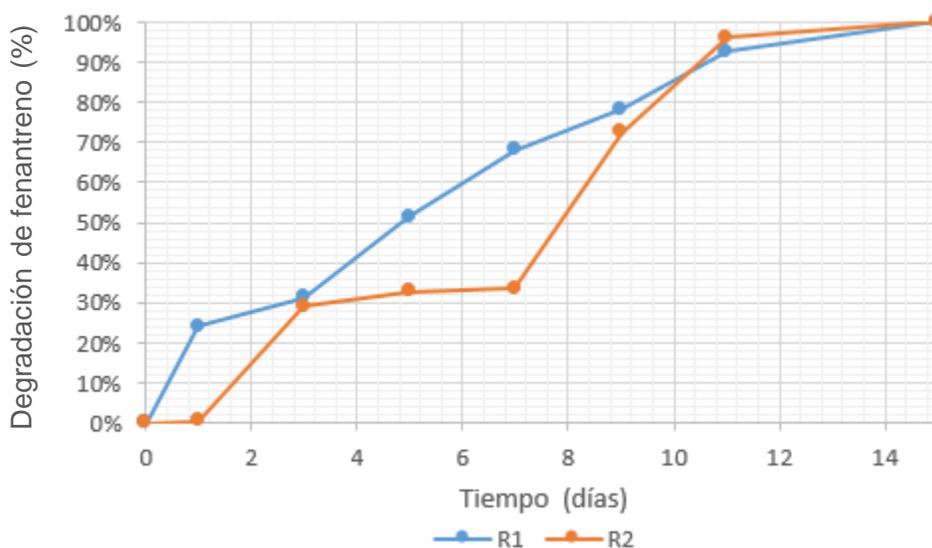


Figura 5.3 Porcentaje degradado total de fenantreno en la fracción sólido-líquido para el reactor 1 y 2 a 60 ppm.

Con base en las pruebas de extracción se observa que la concentración de fenantreno disminuyó al transcurrir la cinética. La concentración inicial total (en el carbón y en el líquido) fue 61.1 y 63.9 ppm, la cual disminuyó hasta 24.9 y 25.1 ppm, respectivamente. El fenantreno fue removido en un 61 y 59 %. La degradación se comportó de manera similar en ambos reactores, siendo un poco más rápida en el reactor 1. Sin embargo se alcanzó una concentración final de fenantreno similar en ambos reactores. En la Figura 5.3, se observa el porcentaje degradación durante la cinética, de acuerdo a la máxima degradación obtenida en cada reactor.

El porcentaje total de volatilización del fenantreno fue de 6 % en el reactor control. La máxima volatilización se presentó durante las primeras 2 horas de iniciar la prueba. A partir de este tiempo la concentración se mantuvo constante. Este porcentaje fue necesario para hacer el balance de masas dentro del reactor.

5.3 Efecto del fenantreno a 200 ppm sobre el consorcio microbiano

En esta prueba se observa un comportamiento similar en ambos reactores inoculados a la misma concentración. La población microbiana se mantuvo en crecimiento. Los resultados se observan en las Figuras 5.4 y 5.5.

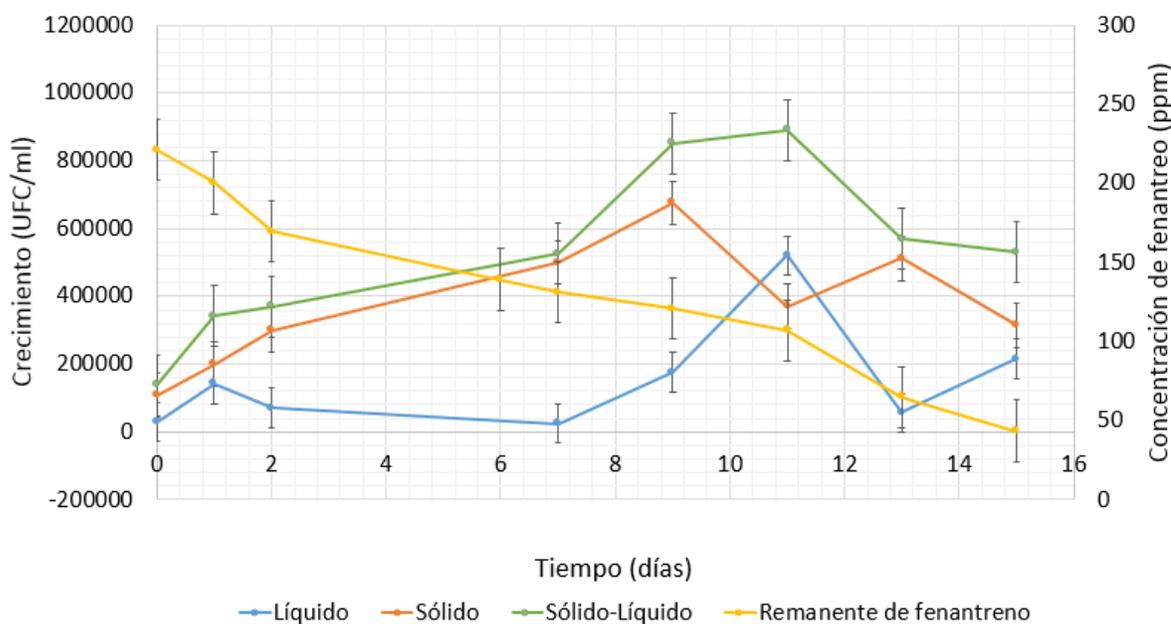


Figura 5.4 Crecimiento microbiano en las diferentes fracciones, líquido, sólido y sólido-líquido para el reactor 1 a 200 ppm (n=3).

Con base en los resultados obtenidos se observó un crecimiento mayor en el carbón que en la fase líquida. El total el crecimiento fue de $1.37E5$ y $2.6E5$ UFC/ml hasta $5.3E5$ y $6.1E5$ UFC/ml, para el reactor uno y dos respectivamente. El crecimiento fue

mayor en la fase sólida que en la fase líquida. Este comportamiento se mantuvo hasta el día 11 y 13 respectivamente, donde aumentaron los microorganismos en el líquido (Figura 5.4).

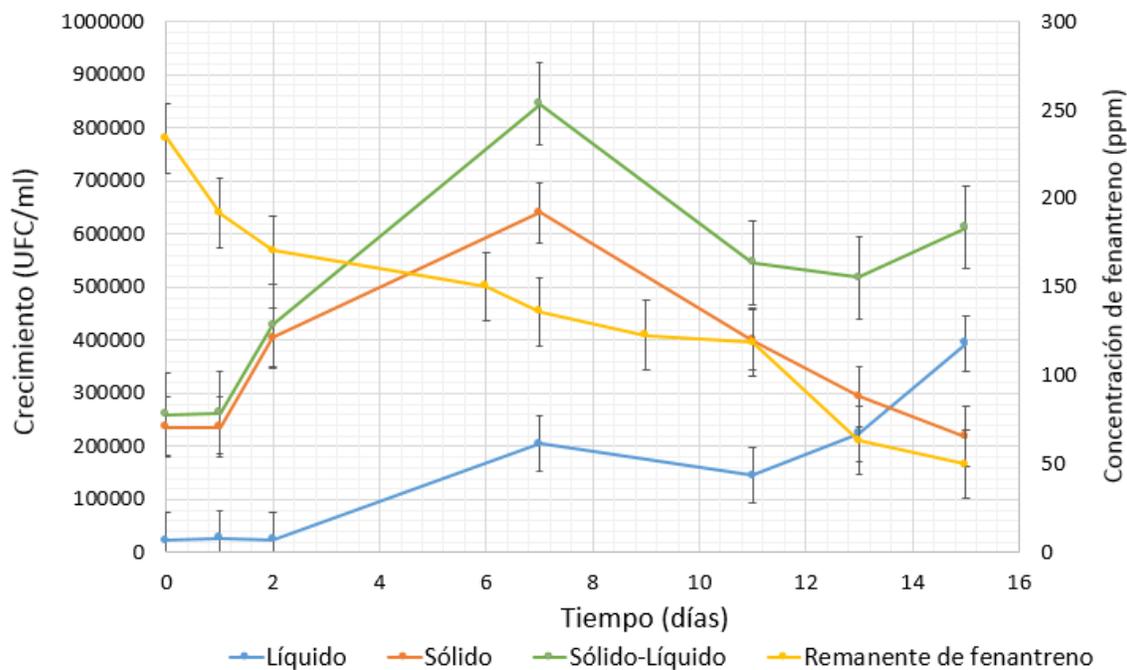


Figura 5.5 Crecimiento microbiano en las diferentes fracciones, líquido, sólido y sólido-líquido para el reactor 2 a 200 ppm (n=3).

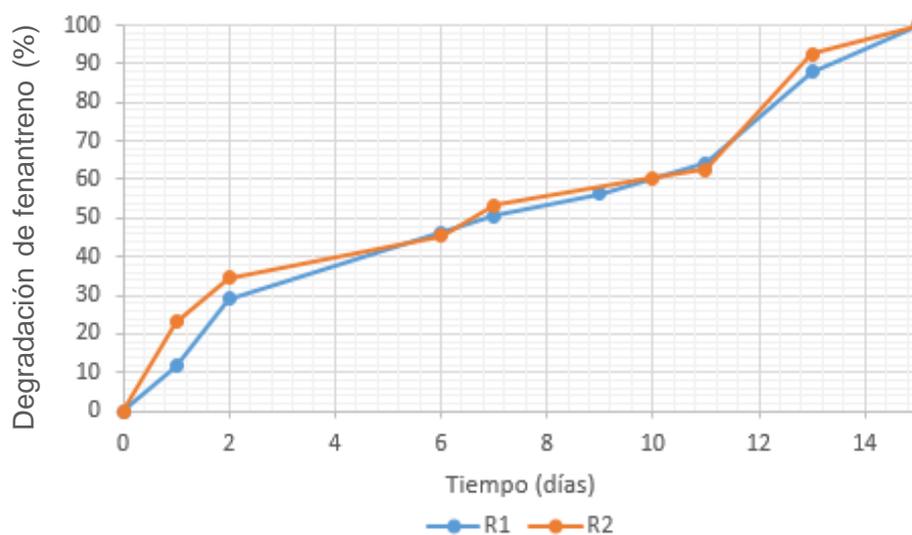


Figura 5.6 Porcentaje degradado total de fenantreno en la fracción sólido-líquido para el reactor 1 y 2 a 200 ppm.

El remanente de fenantreno fue disminuyendo en ambos reactores inoculados. La concentración inicial fue de 221.31 y 234.1 ppm hasta 43.42 y 49.9 ppm respectivamente. La remoción total de fenantreno en cada reactor fue de 80 y 79 % respectivamente. En el reactor control, la máxima volatilización fue de 6 %. Esta volatilización se presentó dentro de las 2 horas desde que se inició la prueba y se mantuvo en concentraciones estables dentro del reactor. La mitad del fenantreno en el medio fue degradado dentro de los primero siete días. En la figura 5.6 se observa el porcentaje degradación durante la cinética, de acuerdo a la máxima degradación obtenida en cada reactor.

5.4 Efecto del fenantreno a 600 ppm sobre el consorcio microbiano

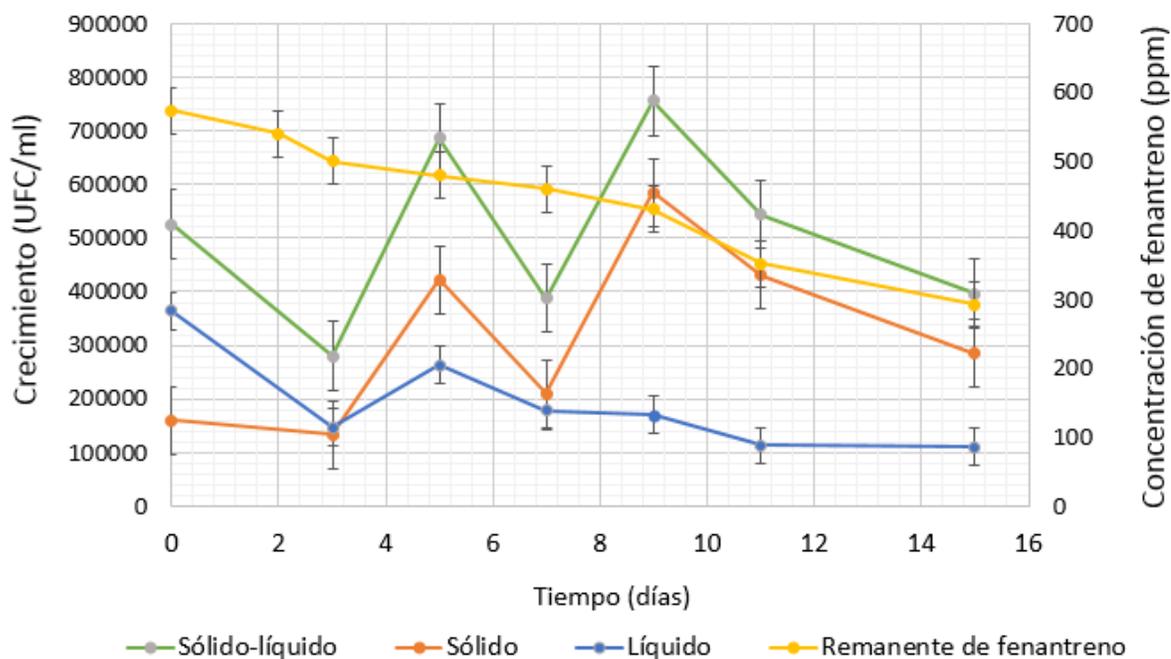


Figura 5.7 Crecimiento microbiano en las diferentes fracciones, líquido, sólido y sólido-líquido para el reactor 1 a 600 ppm (n=3).

Durante la prueba a 600 ppm de fenantreno el crecimiento fue variable durante toda la prueba. El crecimiento bacteriano fue mayor en el carbón, mientras que en el líquido no se observaron incrementos de crecimiento durante la prueba. En el reactor uno se observó mayor variabilidad en el crecimiento, mientras que en el reactor dos el crecimiento fue casi estable a partir del día 3 (Figura 5.7 y 5.8). En general el crecimiento fue de $5.25E5$ y $5.05E5$ UFC/ml a $3.96E5$ y $4.5E5$ UFC/ml para el primer y segundo reactor respectivamente.

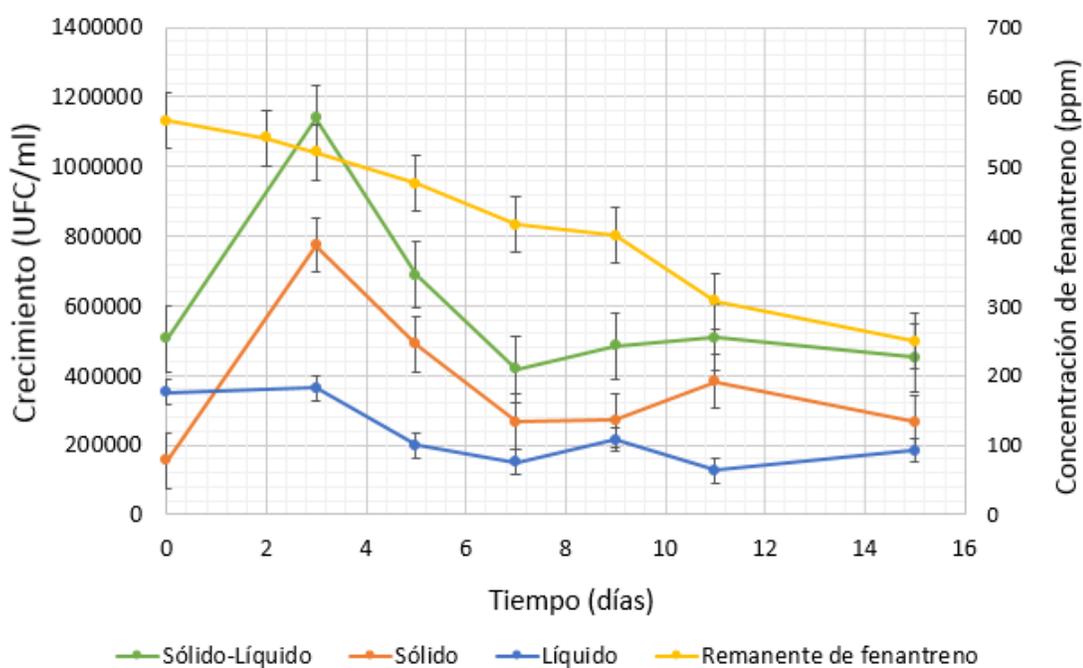


Figura 5.8 Crecimiento microbiano en las diferentes fracciones, líquido, sólido y sólido-líquido para el reactor 2 a 600 ppm (n=3).

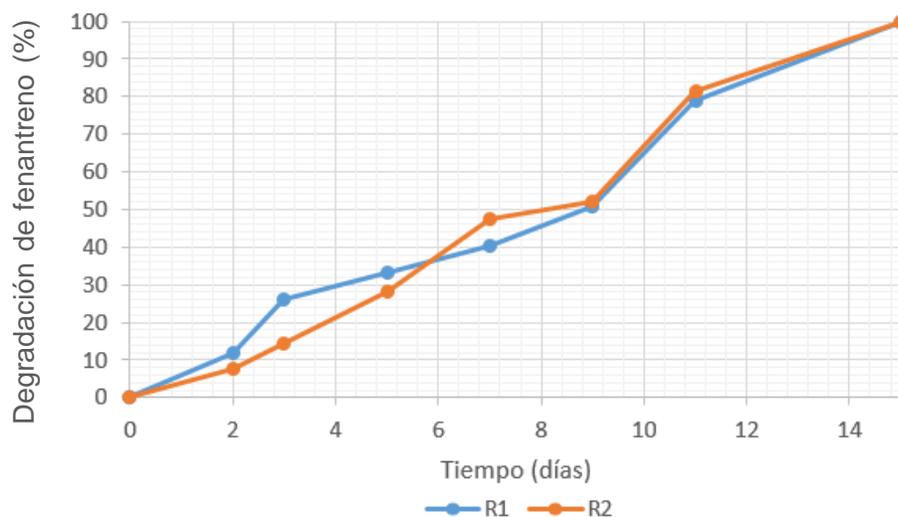


Figura 5.9 Porcentaje degradado total de fenantreno en la fracción sólido-líquido para el reactor 1 y 2 a 600 ppm.

La degradación en ambos reactores inoculados para la misma concentración fue similar, esto se observa en la Figura 5.9. El remanente de fenantreno fue disminuyendo de una concentración de 573.6 y 566.04 ppm a 292.7 y 248.3 ppm, para el primer y segundo reactor respectivamente. El fenantreno removido fue de 49 y 56% respectivamente. En la figura 5.9 se observa el porcentaje degradación durante la cinética, de acuerdo a la máxima degradación obtenida en cada reactor.

5.5 Estimación de parámetros del modelo Gompertz

Con los datos obtenidos se estimaron los parámetros a , b y c para el modelo Gompertz de acuerdo a la Ecuación [1]. El programa *Statgraphics Centurion XVI.11* fue utilizado para ajustar los datos al modelo Gompertz.

Se estimaron los parámetros a , b y c del modelo para conocer y predecir el comportamiento en el crecimiento de los microorganismos en cada concentración evaluada. El intervalo de confianza fue de 95 % y el método de estimación fue el de Marquardt. El programa iteró hasta estimar los parámetros que se ajusten a los datos que se obtuvieron de la cinética de crecimiento.

5.5.1 Ajuste del modelo a 60 ppm de fenantreno

Se evaluaron los datos de máximo crecimiento y tiempo. Se calcularon los puntos de inflexión “t” y “y” que corresponden al tiempo y a la concentración de microorganismos cuando la curva cambia del periodo lag a la fase exponencial. Para esta concentración el tiempo fue de 1.14 días y con un crecimiento de 1.10E5 UFC/ml para a concentración de 60 ppm, de acuerdo a la ecuación [2] y [3].

$$t = \ln \left[\frac{b}{c} \right] \quad [2]$$

$$y = a * exp^{-1} \quad [3]$$

De acuerdo a los datos obtenidos, el consorcio (expuesto a concentraciones menores de las que fue crecido en agua de mar sintética) se adaptó a las condiciones del medio. En el reactor 1 el crecimiento fue rápido, hasta llegar el día 7. A partir de este día se observó una fase estacionaria y el crecimiento fue más lento. A pesar que el fenantreno no se había degradado por completo y a la baja concentración de fenantreno al finalizar la prueba, se pudo causar el desprendimiento de la biopelícula y ocasionar la poca disponibilidad del fenantreno a los microorganismos. Lo anterior se observa en la Figura 5.10.

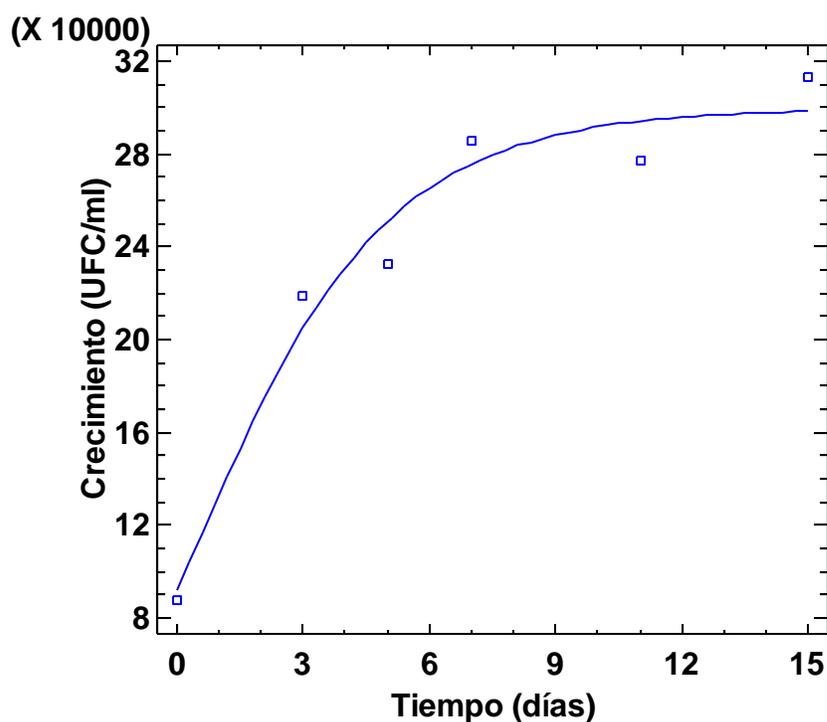


Figura 5.10 Ajuste del crecimiento microbiano al modelo Gompertz para el reactor 1 a 60 ppm.

De acuerdo a los datos presentados en la gráfica de crecimiento para el reactor 2 inoculado (Figura 5.11) se calculó el tiempo y la concentración cuando los microorganismos entran a la fase estacionaria, en los resultados se observa que a partir del día 1 tuvo un crecimiento de $1.47E5$ UFC/ml, de acuerdo a la ecuación [2] y [3]. Se observa un aumento de la biomasa en general, aunque en el líquido el crecimiento fue más variable. También se observa una pérdida de biomasa al finalizar la prueba, en el día nueve, esto puede deberse a la falta de nutrientes en el medio lo que limita el crecimiento del consorcio en el reactor.

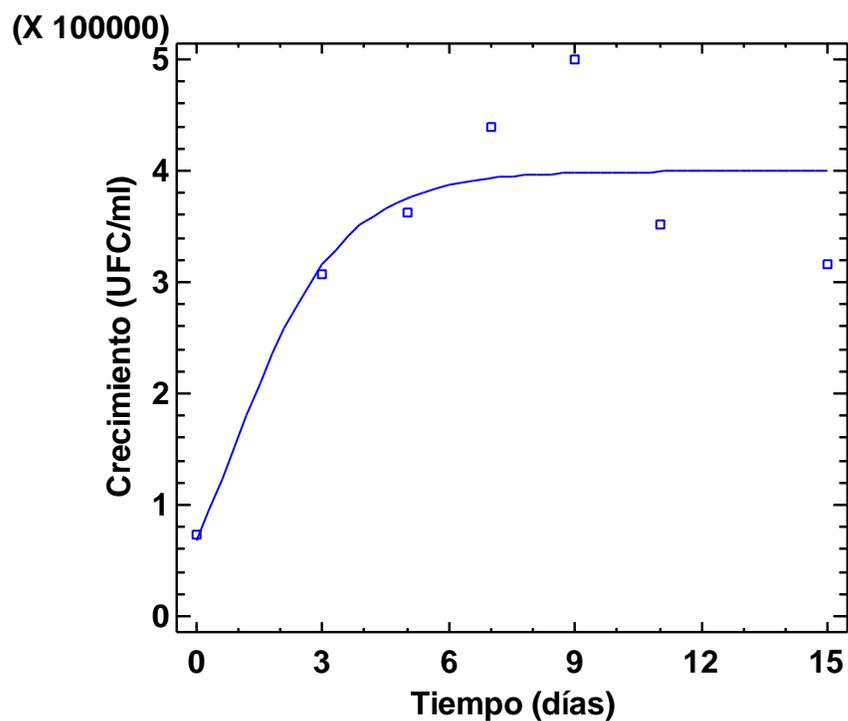


Figura 5.11 Ajuste del crecimiento microbiano al modelo Gompertz para el reactor 2 a 60 ppm.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado (Ecuación 4) para el reactor 1, explica 94 % de la variabilidad en el estadístico R-Cuadrada ajustada. El error estándar del estimado, muestra que la desviación estándar de los residuos es de 1.9E4. Para el reactor 2 (Ecuación 5), el estadístico R-Cuadrada ajustada es de 69.9% y una desviación estándar de los residuos es 7.4E4. Las ecuaciones del modelo de regresión no lineal ajustado para describir la relación de las variables fueron:

$$y = 2.9E5 * \exp(-1.19 * \exp(-0.38 * x)) \quad [4]$$

$$y = 3.9E5 * \exp(-1.77 * \exp(-0.67 * x)) \quad [5]$$

$$V_{max} = \frac{ac}{e} \quad [6]$$

Tabla 5.1 Cálculo de parámetros del modelo Gompertz para el crecimiento microbiano a 60 ppm.

Reactor	V_{max} de crecimiento [6]	Crecimiento máximo (y_{max}) [7]
1	4.05E4	1.10E5
2	9.61e4	1.47E5

Para evaluar la concentración de fenantreno degradada, se restaron los datos de remanente de fenantreno obtenidos durante la prueba a la concentración inicial. Los datos de degradación y tiempo fueron evaluados en el programa para su ajuste al modelo.

En el reactor uno el estadístico R-Cuadrada ajustada indica que el modelo, así ajustado explica 97.2 %. En el reactor 2 el estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 93.8 % de la variabilidad. El estadístico R-Cuadrada ajustada es de 91.3 %. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 4.2E5.

En ambos reactores se observa que durante la fase de aclimatación del consorcio a la concentración de fenantreno se generó un aumento en la degradación. Los resultados coinciden con las gráficas de crecimiento microbiano, donde se observa una rápida adaptación al medio, que genera un mayor consumo de fenantreno. El tiempo de vida media (DT50) del fenantreno en el sustrato equivale al tiempo que se tarda en degradar el 50 %. Se hizo el cálculo de acuerdo a la Ecuación 7. Para el reactor uno es de 5.3 y de 8.3 días para el reactor 2. Esto significa que la mayor parte del fenantreno se degrada dentro de ese tiempo, de acuerdo con la concentración máxima degradada. Los parámetros estimados para el ajuste de la degradación de fenantreno que se usaron para graficar se muestran en la siguiente tabla.

$$DT50 = \frac{\ln \left[\frac{\ln(0.5)}{-b} \right]}{-c} \quad [7]$$

Tabla 5.2 Estimación de parámetros del modelo Gompertz para la degradación de fenantreno a 60 ppm.

Reactor	a	b	c	V _{max} [6]	D _{T50} [7]
R1	41.56	2.48	0.24	3.67	5.3
R2	44.97	3.85	0.20	3.31	8.2

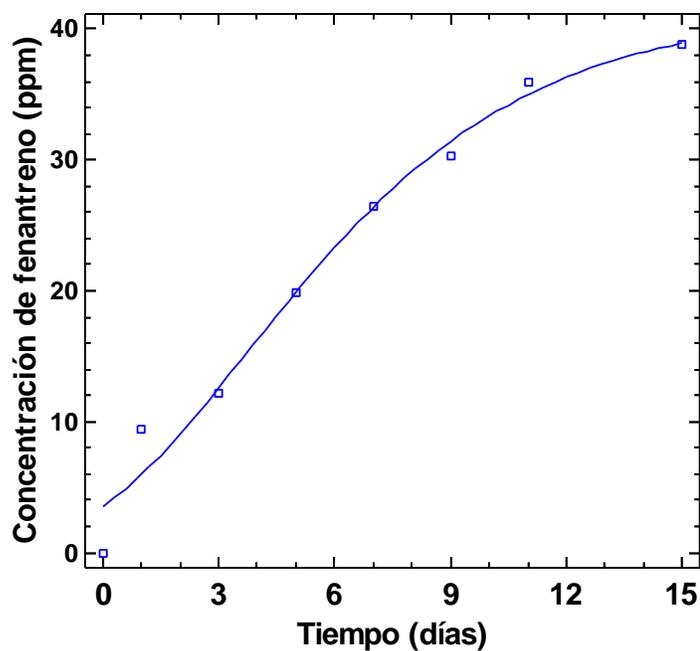


Figura 5.12 Ajuste de la degradación de fenantreno al modelo Gompertz para el reactor 1 a 60 ppm.

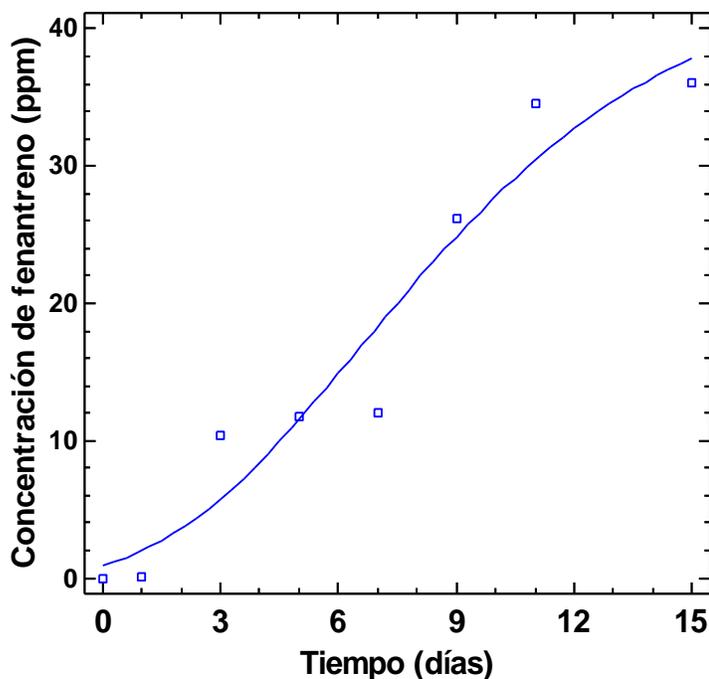


Figura 5.13 Ajuste de la degradación al modelo Gompertz para el reactor 2 a 60 ppm.

5.5.2 Ajuste del modelo a 200 ppm de fenantreno

A la concentración de 200 ppm de fenantreno, el consorcio en el primer reactor inoculado tuvo un rápido crecimiento desde el día uno alcanzando $3.42E05$ UFC/ml, su máximo crecimiento fue el día 10 (Figura 5.14). Durante el crecimiento se observa una fase lag y una fase estacionaria poco prolongada esto puede poder ser causa de la sensibilidad del consorcio a las variaciones en concentración en el medio. Esto puede notarse en los puntos de inflexión “t” y “y” de acuerdo a las ecuaciones [2] y [3]. En el caso del reactor uno el modelo explica 70.1% de la variabilidad en UFC/ml. El estadístico R-cuadrada ajustada es de 58.2 %.

En el segundo reactor inoculado, el crecimiento fue lento. A partir del día 3 se tuvo un rápido crecimiento hasta el día 7, transcurrido este día la biomasa disminuyó en el reactor y se mantuvo casi estable del día 11 al 15 (Figura 5.15). Estos resultados muestran una clara tendencia de adaptación con el aumento de la concentración. En este caso se explica 74.2 % de la variabilidad. El estadístico R-Cuadrada ajustada es

61.3 %. Las ecuaciones del modelo de regresión no lineal ajustado para describir la relación de las variables para el reactor uno y dos respectivamente, se muestran a continuación:

$$y = 6.8E5 * \exp(-1.43 * \exp(-0.49 * x)) \quad [8]$$

$$y = 6.3E5 * \exp(-1.29 * \exp(-0.6 * x)) \quad [9]$$

Tabla 5.3 Cálculo de parámetros del modelo Gompertz para el crecimiento microbiano a 200 ppm.

Reactor	V_{\max} de crecimiento [6]	Crecimiento máximo (y_{\max}) [7]
1	1.23E5	2.2E5
2	1.30E5	2.3E5

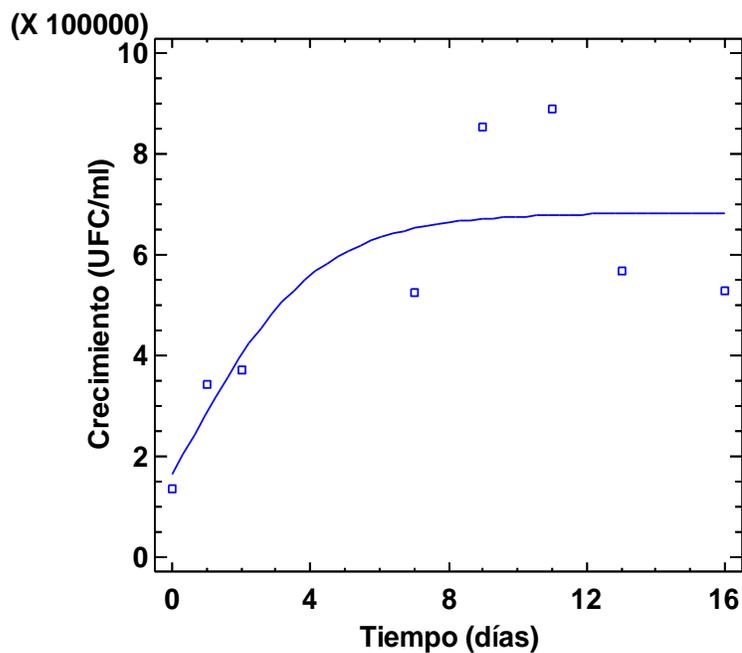


Figura 5.14 Ajuste del crecimiento microbiano al modelo Gompertz para el reactor 1 a 200 ppm.

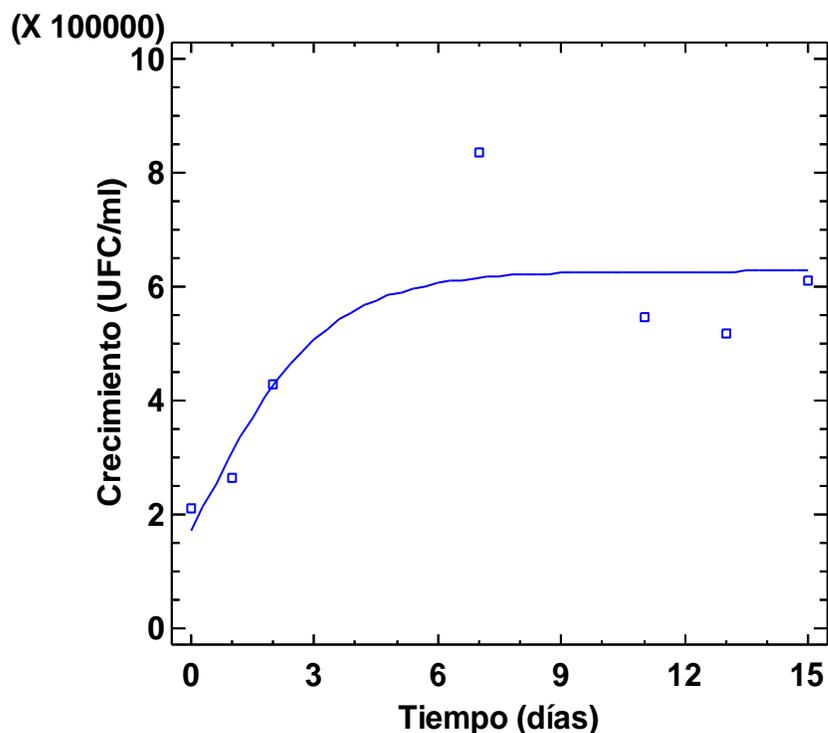


Figura 5.15 Ajuste del crecimiento microbiano al modelo Gompertz para el reactor 2 a 200 ppm.

Para evaluar la concentración de fenantreno degradada, se restaron los datos de remanente de fenantreno obtenidos durante la prueba, a la concentración inicial. Los datos de degradación y tiempo fueron evaluados en el programa para su ajuste al modelo.

La degradación inicial del consorcio fue de $6.13E-8$ y $1.61E-7$ mg/UFC, mientras que la máxima degradación fue similar para ambos reactores, siendo de $3.36E-7$ y $3.01E-7$ mg/UFC para el primer y segundo reactor respectivamente. Durante este periodo el consorcio continuó creciendo de manera lenta, de acuerdo a la gráfica de crecimiento (fase estacionaria).

Para el reactor uno el modelo Gompertz explica 95.5 % de la variabilidad del fenantreno (ppm). El estadístico R-Cuadrada ajustada es de 94.0 % (Figura 5.16). En el reactor dos el modelo explica el 92.3 % y el estadístico R-Cuadrada ajustada es de 89.8 % (Figura 5.17). El tiempo de vida media (DT50) del fenantreno en el sustrato

equivale al tiempo que se tarda en degradar el 50 % de “a” (Ecuación 6). Para el reactor uno es de 12.3 y de 15 días para el reactor 2. Esto significa que la mayor parte del fenantreno se degrada dentro de ese tiempo, de acuerdo con la concentración máxima degradada. Los parámetros estimados para el ajuste de la degradación de fenantreno que se usaron para graficar se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 5.4 Estimación de parámetros del modelo Gompertz para la degradación de fenantreno a 200 ppm.

Reactor	a	b	c	Vmax [6]	DT50 [7]
1	290	2.67	0.11	11.73	12.3
2	457.26	2.73	0.07	11.78	15

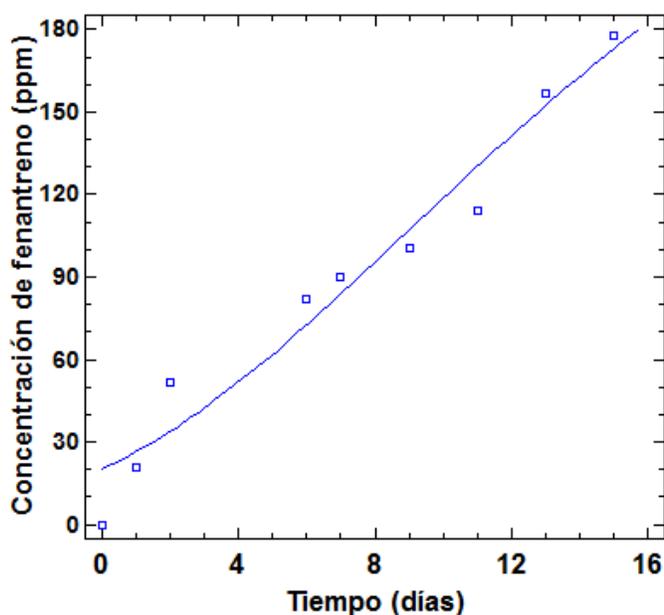


Figura 5.16 Ajuste de la degradación al modelo Gompertz para el reactor 1 a 200 ppm

5.5.3 Ajuste del modelo a 600 ppm de fenantreno

Durante la prueba en ambos reactores inoculados, se observa un crecimiento variable. Al inicio de la prueba la cantidad de microorganismos descendió y se observó que el crecimiento varió. El porcentaje de pérdida en los microorganismos en ambos reactores fue similar, fue de 18 %. La alta concentración de fenantreno en el reactor, se reflejó en la disminución del crecimiento de los microorganismos. Se observó que la concentración inicial del medio, tiene un efecto significativo sobre el crecimiento de la biomasa en el reactor. Se evaluaron los datos de crecimiento y tiempo, pero no se obtuvo un ajuste al modelo Gompertz para el crecimiento microbiano.

Para evaluar la concentración de fenantreno degradada, se restaron los datos de remanente de fenantreno obtenidos durante la prueba, a la concentración inicial. Los datos de degradación y tiempo fueron evaluados en el programa para su ajuste al modelo. Con los datos de degradación de fenantreno se ajustó al modelo Gompertz,

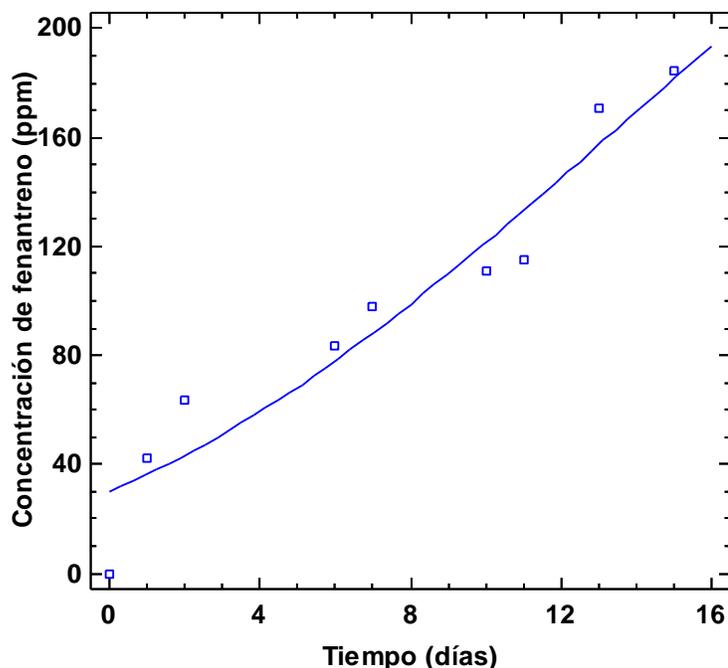


Figura 5.17 Ajuste de la degradación al modelo Gompertz para el reactor 2 a 200 ppm.

se estimaron los parámetros del modelo y se obtuvo información para el análisis de los resultados.

La tasa de degradación inicial fue de $9.13E-8$ y $2.63E-8$ hasta $7.09E-7$ y $7.06E-7$ mg/UFC para el primer y segundo reactor respectivamente. Debido al aumento de la concentración, se observó una disminución de la actividad de los microorganismos generada por la alta concentración de fenantreno en el reactor. Lo anterior se vio reflejado en el crecimiento de los microorganismos y en su capacidad degradadora.

Para la degradación el reactor uno, el estadístico R-Cuadrada ajustada es de 96 % (Figura 5.18). En el reactor dos el estadístico R-Cuadrada ajustada es de 98 % (Figura 5.19). El tiempo de vida media (DT50), para el reactor uno es de 12.4 y de 9.5 días para el reactor 2 (Ecuación 6). Esto significa que la mayor parte del fenantreno se degrada dentro de ese tiempo, de acuerdo con la concentración máxima degradada. Las velocidades máximas de degradación fueron de 21.21 y de 27.5 mg/día para el primer y segundo reactor respectivamente.

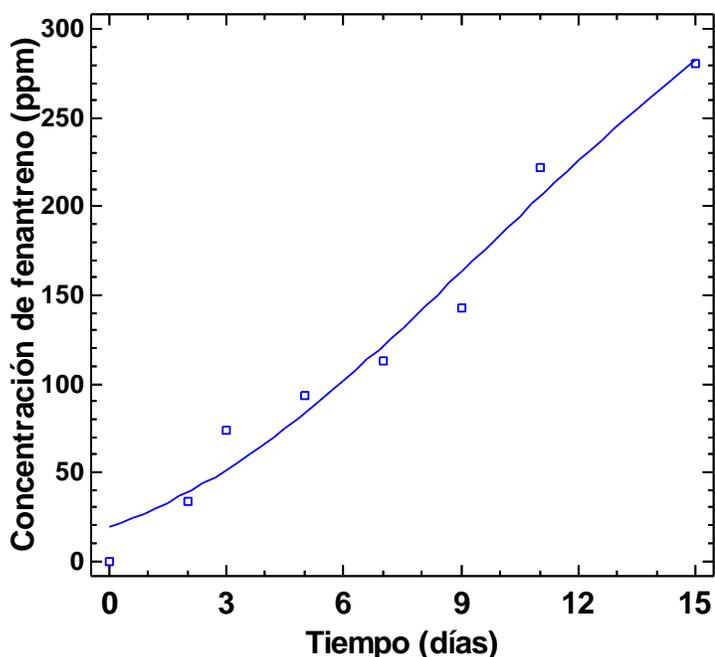


Figura 5.18 Ajuste de la degradación al modelo Gompertz para el reactor 1 a 600 ppm

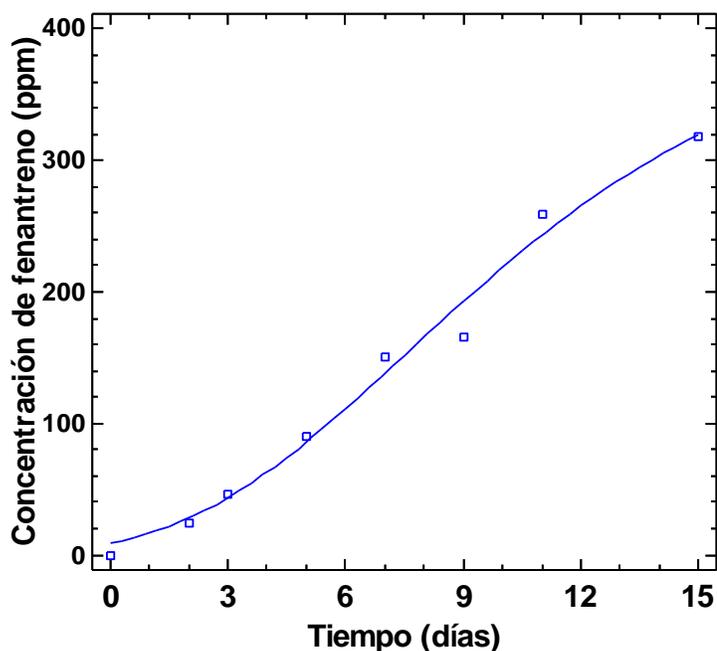


Figura 5.19 Ajuste de la degradación al modelo Gompertz para el reactor 2 a 600 ppm

5.6 Evaluación de las diferentes concentraciones

Los datos de remoción de fenantreno se sometieron aun análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa *Statgraphics Centurion XVI.II*, para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa entre la remoción ocasionada por las diferentes concentraciones en el medio (60, 200 y 600 ppm). El análisis indica que entre los tratamientos existen diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0 % de confianza, se identificaron 3 gurpos homogéneos (60,200 y 600 ppm). Se encontró que entre réplicas no existe diferencia estadísticamente significativa (entre reactor uno y dos de cada prueba). El método empleado para discriminar entre las medias fue el procedimiento de diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher.

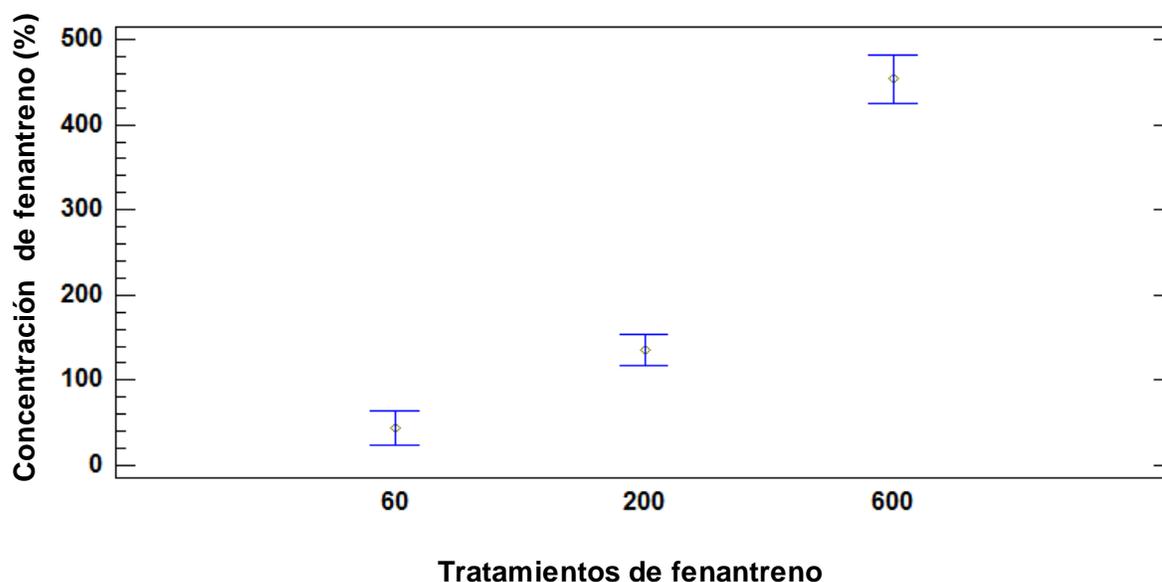


Figura 5.20 Diferencia significativa utilizando el método de Fisher

Comparando los resultados obtenidos en este trabajo con estudios anteriores, se obtiene un comportamiento similar en el crecimiento del consorcio, respecto a la variación de la concentración en el medio. En otros estudios se ha demostrado que a concentraciones por arriba de 230 ppm se observan efectos de inhibición sobre los microorganismos (Madueño *et al.*, 2009 y Lu *et al.*, 2012).

En la figura 5.21 se observa el tiempo y la variación en la concentración de fenantreno representadas en porcentajes de las concentraciones iniciales de 60, 200 y 600 ppm. En la gráfica se observa que el tiempo de vida media del fenantreno (DT50) se alcanza más rápidamente a 60 ppm. Lo anterior demuestra que es evidente que el tiempo requerido para completar la degradación de fenantreno a bajas concentraciones es menor que el requerido para altas concentraciones. También se puede observar que la degradación de fenantreno fue mayor a 200 ppm, esto debido a que el aumento en la concentración en el medio, acelera el crecimiento microbiano.

Con base en la degradación, se observó que los microorganismos fueron capaces de utilizar el fenantreno como fuente de carbono para la producción de biomasa. Sin

embargo reducen su capacidad degradadora y su crecimiento al estar expuestos a concentraciones más elevadas. Se presentó un efecto inhibitorio a concentraciones altas de fenantreno. A 600 ppm se observó un descenso en el crecimiento de los microorganismos. Esto puede deberse a un proceso de desorción a concentraciones altas de fenantreno, que afectan la disponibilidad del fenantreno en la fase móvil (carbón) (Li *et al.*, 2012). También se puede deber a la presencia de metabolitos tóxicos para los microorganismos, que son producto de la degradación del fenantreno y que se acumularon en el medio, lo que inhibió el crecimiento en el reactor (Moreno *et al.*, 2009 y Lu *et al.*, 2012). El tiempo de vida media del fenantreno en el reactor fue mayor, conforme la concentración fue aumentando. Lo anterior puede ser causado por la dificultad de los microorganismos para degradar concentraciones más altas de fenantreno.

Considerando el modelo Gompertz y la comparación entre los remanentes (Figura 5.21), se puede decir que a la concentración de 200 ppm se tiene una mejor remoción de fenantreno. Mientras que a concentraciones por arriba de 200 ppm como es el caso de 600 ppm se observa un efecto inhibitorio, que influye en el crecimiento del consorcio en el reactor y en la degradación del fenantreno.

Algunos autores (Miranda *et al.*, 2007) reportan porcentajes de degradación del 39.8% a concentraciones menores de 60 ppm. Mientras que otros reportan remociones de 85% a concentraciones bajas de 20 a 100 ppm. En condiciones similares, a concentraciones en el rango de 200 ppm los porcentajes de degradación que han sido reportado son de 23.03 % en 12 días (Madueño *et al.*, 2009) y de 74 % en un periodo de 4 días a una concentración de 100 ppm (Arulazhagan *et al.*, 2010). A concentraciones más altas de fenantreno (Li *et al.*, 2012), por arriba de 200 ppm se han reportado efectos inhibitorios en el crecimiento bacteriano, poca degradación de fenantreno y pérdida de la capacidad degradadora de los microorganismos.

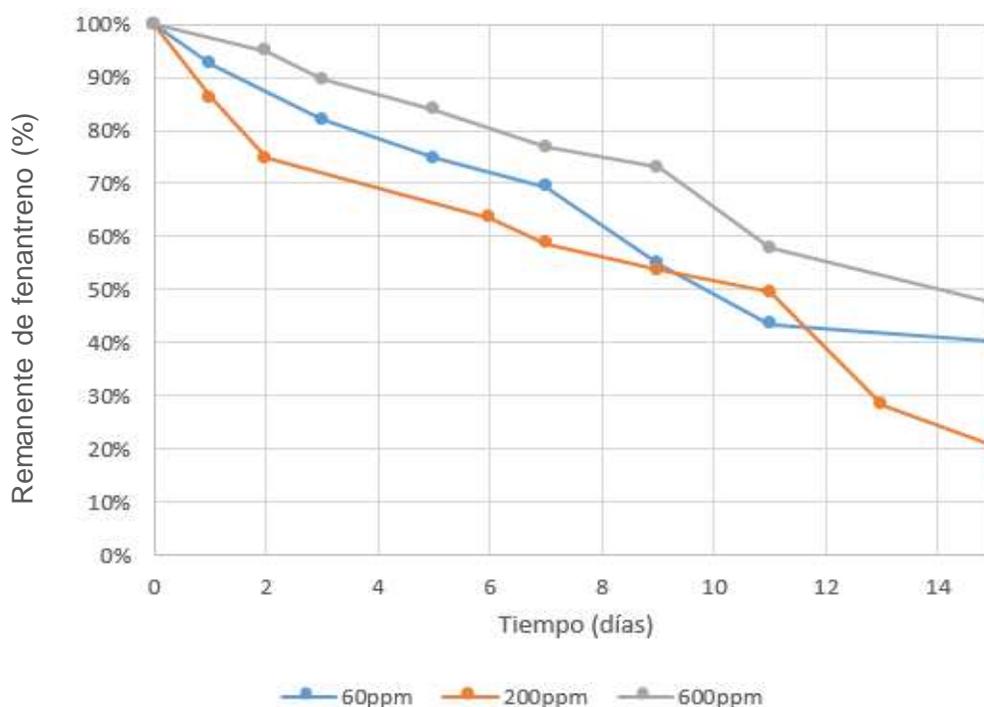


Figura 5.21 Comparación entre los remanentes de fenantreno promedio de los reactores 1 y 2 para las pruebas a 60, 200 y 600 ppm.

VI. CONCLUSIONES

En esta investigación se evaluó el comportamiento de los microorganismos a diferentes cambios en la concentración de fenantreno. Se analizaron los resultados experimentales de tres reactores *batch* de lecho móvil. Dos con inóculo y un control a tres diferentes concentraciones, a 60, 200 y 600 ppm de fenantreno. Con base en los análisis realizados, se presentan las siguientes conclusiones:

1. La variación de la concentración de fenantreno en el medio tiene un efecto en el crecimiento de los microorganismos y la degradación de fenantreno.
2. A la concentración de 60 ppm la población viable de bacterias fue en aumento. El porcentaje de degradación fue de 59.9 %, este porcentaje fue menor que a

la concentración de 200 ppm que fue de 79.53 %. Lo anterior se asocia a la disponibilidad del fenantreno en el carbón y disponibilidad de una fuente de carbono para los microorganismos a 60 ppm.

3. La máxima degradación alcanzada fue de 79.5 % y se presentó a la concentración de 200 ppm. El crecimiento y la actividad bacteriana fueron en aumento. Lo anterior evidencia una aclimatación de los microorganismos al medio al aumentar a esta concentración. La máxima velocidad de degradación se alcanzó a esta concentración fue de 11.75 mg/día.
4. Para la concentración de 600 ppm el porcentaje de degradación fue de 52.5 %. A esta concentración el porcentaje de pérdida en los microorganismos (UFC/ml) fue de 18 %. Al finalizar la prueba la cantidad de microorganismos fue menor que la inoculada en el reactor. Lo anterior demuestra que la concentración afecta el crecimiento de los microorganismos y su degradación. Se presenta una posible inhibición por el sustrato o por los metabolitos producidos de la degradación.
5. El tiempo de vida media real del fenantreno y el tiempo calculado con los parámetros estimados del modelo analítico Gompertz, fueron similares. Esto ayuda a comprender mejor el comportamiento de la degradación de fenantreno a diferentes concentraciones y establecer condiciones óptimas en estudios posteriores. Conforme aumenta la concentración de fenantreno en el medio, el tiempo del tratamiento se ve afectado. Los microorganismos requieren mayor tiempo para degradar concentraciones altas de fenantreno que se ve reflejado en parámetros como la D_{T50} .

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Arulazhagan P., Vasudevan N., y Yeom I. (2010). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon by halotolerant bacterial consortium isolated from marine environment. International Journal of Science Technology, 7(4), 639-652.
- Barwal A. y Chaudhary R. (2014). To study the performance of biocarriers in moving bed biofilm reactor (MBBR) technology and kinetics of biofilm for retrofitting the existing aerobic treatment systems: a review. Journal of Environmental Sciences and Biotechnology, 13, 285–299.
- Carrillo A. (2009). Evaluación de la contaminación por Hidrocarburos en la zona costera de Progreso. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Yucatán, México.
- Casas G., Rodríguez D. y Afanador, G. (2010). Propiedades matemáticas del modelo de Gompertz y su aplicación al crecimiento de cerdos. Ciencias Pecuarias No. 3(23), 349-358.
- Fernandez M. (2014). Evaluación de un reactor a escala laboratorio para la degradación de fenantreno. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Yucatán, México.
- Flores D. y Posada J. (2007). Diseño conceptual de un reactor de lecho fluidizado a escala laboratorio para el tratamiento de aguas residuales. Tesis de Licenciatura, Universidad Eafit, Medellín.
- García M. y Peralta M. (2008). Cometabolism in the biodegradation of Hydrocarbons. Revista Mexicana de Ingeniería Química, Vol.7,1-12.
- Guieysse B., Cirne M. y Mattiasson B. (2001). Microbial degradation of phenanthrene and pyrene in two-liquid phases-partitioning bioreactor. Appl Microbiol Biotechnol, 56, 796–802.
- Gutiérrez M. (2014). Evaluación de la capacidad degradadora de fenantreno en agua de mar por cepas puras. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Yucatán, México.
- Izquierdo A. (2013). Biodegradación de HAPs durante la biorremediación aeróbica de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. Análisis de poblaciones bacterianas y genes funcionales. Tesis de Doctorado, Universidad de Barcelona, España.

- Koch E. (2011). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by Arthrobacter Sp. UG50 isolated from petroleum refinery wastes. Tesis de Maestria Ontario, University of Guelph, Canada.
- Li X., Shuang S., Li X., Kong L., Xu L., Tai P., Gong, Z. (2012). The effect of concentrations and properties of phenanthrene, pyrene, and benzo(a) pyrene on desorption in contaminated soil aged for 1 year. Remediation And Management Of Contaminated Or Degraded Lands, 13:375–382.
- Lu J., Dang Z., Lu G., Yang C., Yi X. y Guo C. (2012). Biodegradation Kinetics of Phenanthrene by a Fusant Strain. Journal of Current Microbiology, 65:225-230.
- Ma J., Zhang S., Qu J., Yan A. y Chen F. (2015). Development of bacterial consortia and biodegradation ability under different PAH stresses. Advanced Materials Research, Vols. 1073-1076, 176-182.
- Madueño L., Copotelli B. y Morelly I. (2009). Efecto de la inoculación de la cepa Sphingomonas paucimobilis 20006FA sobre la composición de un consorcio bacteriano degradador de fenantreno. Revista argentina de microbiología, No. 2(41).
- Mehdi S., Khajeh K., Shavandi M., Ventosa A. y Amoozegar M. (2012). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halophilic microbial consortium. Journal Microbiology and Biotechnology, No. 95, 789-798.
- Miranda M., Delgadillo J. y Ferrra A. (2007). Degradación del fenantreno por microorganismos en la rizosfera del pasto alemán. Revista Redalyc, 25-33.
- Moliterni E., Jiménez R., Villar M., Rodriguez L., Fernández F. y Villaseñor J. (2012). Kinetics of biodegradation of diesel fuel by enriched microbial consortia from polluted soils. International Journal of Environmental Science and Technology 9, 749–758.
- Moreno I. y Buitrón G. (2008). Biodegradación óptima de compuestos fenólicos en un reactor discontinuo secuencial. Biotecnología, No. 2(12), 49-59.
- Peleg M. y Corradini M. (2011). Microbial Growth Curves: What the Models Tell us and what they cannot. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, No. 51, 917–945.
- Puyol D. (2010). Biodegradación anaerobia del clorofenoles en aguas residuales. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, España.
- Rosales L. (2008). Biorremediación de suelos contaminados con aceite usado de automovil con el hongo de la pudrición blanca Pleurotus ostreatus (SETAS) en Durango. Tesis de Maestria, Instituto Politecnico Nacional, Victoria de Durango, Durango.

- Santiesteban N. y López A. (2008). Descripción e importancia de algunos modelos predictivos utilizados como herramientas para la conservación de alimentos. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos, 2-2, 14-26.
- Sarkar P., Roysten A. y Ghosh S. (2013). Degradation of aromatic petroleum hydrocarbons (BTEX) by a solvent tolerant bacterial consortium. Journal of Urban and Environmental Engineering, No. 2 (7), 274-279.
- Vera L., Cázares E., Covarrubias R. y Camacho E. (2002). Metodología en línea para la determinación de hidrocarburos aromáticos polinucleares en agua a nivel de ultratrazas. Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 18 (1) 5-16.
- Viñas M. (2005). Biodegradación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. Tesis de doctorado, Universidad de Barcelona, España.
- Xiang L., Xiao-min M., Jian-gang Y., Barry D. y Ling L. (2006). Experiments and modelling of phenanthrene biodegradation in the aqueous phase by a mixed culture. Journal of Environmental Sciences, No. 1 (8), 147-153.