



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE YUCATÁN
FACULTAD DE INGENIERÍA
UNIDAD DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**“EVALUACIÓN DE BIOPELÍCULAS PARA LA
DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS
POLICÍCLICOS EN AGUA DE MAR”**

T E S I S

PRESENTADA POR:

BIOL. EMMANUEL ALEJANDRO GÓNGORA BURGOS

EN OPCIÓN AL GRADO DE

**MAESTRÍA EN INGENIERÍA
OPCIÓN AMBIENTAL**

ASESORA INTERNA

DRA. MARÍA DEL CARMEN PONCE CABALLERO

ASESOR EXTERNO

DR. CLEDIR RODRIGUES SANTOS

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2019

“Aunque este trabajo hubiere servido para el examen de grado y hubiera sido aprobado por el H. Sínodo, sólo su autor es responsable de las doctrinas emitidas en él”

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco al CONACYT por la beca otorgada para mis estudios de maestría.

Agradezco a la beca mixta del CONACYT para realizar mi estancia de investigación en la Universidad de la Frontera (UFRO) en la ciudad de Temuco en Chile durante agosto de 2017 a enero de 2018.

Agradezco al Núcleo Científico y Tecnológico BIOREN-UFRO y a la Bq. Karina Alejandra Godoy Sánchez por el apoyo en los análisis de imagen realizados en el microscopio STEM SU-3500 de marca Hitachi.

Agradezco al cuerpo de técnicos del Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la FIUADY, la M.I. Cinthia Carolina Gamboa Loira, al M.C. Avel Adolfo González Sánchez y a la LQ. Olga Briceño Pérez por el apoyo, así como al Dr. German Giacoman.

Agradezco a mis asesores de tesis la Dra. María del Carmen Ponce Caballero y al Dr. Cledir Rodrigues Santos.

RESUMEN

Fenantreno, acenafteno y fluoranteno pertenecen a los 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) más peligrosos en el ambiente de acuerdo con la USEPA (Agencia de Protección Ambiental de los EUA). Su presencia en los organismos biológicos y en los sistemas ambientales significan efectos mutagénicos, teratogénicos, tóxicos, endocrinos y fisicoquímicos, por ello se consideran prioritarios para su rápida eliminación. Siendo los ecosistemas marinos de importancia comercial e industrial para México y el mundo, estos representan la mayor cuenca de hidrocarburos, vertidos intencional y no intencionalmente por fuentes antropogénicas y naturales.

A pesar de que, los derrames a gran escala son socialmente más alarmantes, son los micro y medianos derrames los que aportan la mayor cantidad de hidrocarburos anualmente a los océanos. A diferencia de los diferentes métodos físicos para la degradación de HAPs, son los microorganismos los que juegan el mayor rol en la mitigación de este tipo de impactos ambientales.

Este trabajo consistió en la implementación de un sistema de biorremediación de agua de mar contaminada con fenantreno, acenafteno y fluoranteno (HAPs de mayor importancia por sus efectos biológicos en ecosistemas marinos). Por ello, el objetivo general de este trabajo fue evaluar el uso de biopelículas para la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua de mar. Fenantreno, es generalmente usado como modelo para estudios de biodegradación de HAPs. Fluoranteno es uno de los contaminantes más abundantes en el ambiente y acenafteno es producido para fabricar colorantes, insecticidas, fungicidas, plásticos y productos farmacéuticos.

Mutag Biochip es un acarreador de biopelículas que implementa la tecnología Reactor de Biopelícula de Lecho Móvil (MBBR: moving bed biofilm reactor) en el tratamiento biológico de aguas residuales y se basa en la inmovilización de microorganismos en la superficie activa del acarreador para que estos realicen la remoción de los elementos a degradar. Para este estudio, el acarreador se implementó para cultivar consorcios microbiológicos y remover fenantreno, acenafteno y fluoranteno en agua de mar.

Se implementaron 4 tratamientos para la degradación de los HAPs antes mencionados: 1. Consorcio biológico formado (CB) fue un consorcio biológico de 5 cepas bacterianas marinas previamente caracterizadas por su habilidad de degradación de HAPs; 2. Consorcio natural (CN), fue un consorcio natural de microorganismos filtrados de agua de mar muestreada en un muelle local; 3. Control 1 (C1) sirvió para determinar la volatilización de los HAPs en ausencia del soporte Mutag Biochip y 4. Control 2 (C2) sirvió para determinar la concentración de HAPs impregnados en los soportes Mutag Biochip.

El diseño experimental consistió en tres etapas. Etapa 1. Caracterización del soporte. Etapa 2. Crecimiento de los consorcios CB y CN en presencia de fenantreno, acenafteno y fluoranteno; y cinética de degradación de los HAPs durante los días 0, 1,

2, 3, 5, 7, 9, 11, 14 y 18 implementando los 4 tratamientos antes mencionados. Los muestreos fueron cuadruplicados para CB y CN; y para los controles C1 y C2 se realizó un muestreo. Etapa 3. Caracterización e identificación de las cepas bacterianas cultivadas en los consorcios.

Se identificaron que las cepas: A2A, C3C y D2A, pertenecen a las especies *Bacillus pumilus*, *Microbacterium keratanolyticum* y *Dietzia aurantiaca*, respectivamente. Mientras que las cepas L2F y L21 pertenecen a la especie *Halomonas* sp. Estas cepas conformaron el consorcio bacteriano.

La diversidad y porcentaje de abundancia del consorcio natural fue la siguiente: *Roseovarius* sp. 29 %, *Ruegeria* sp. 2 %, *Salipiger* sp. 5 %, *Marinobacter* sp. 1 %, *Idiomarina* sp. 2 %, *Alcanivorax* sp. 6 % y *Halomonas* sp. 31 %. A su vez, 15 % de la abundancia correspondió a bacterias pertenecientes al phylum Proteobacteria y 5 % de la abundancia correspondió a especies pertenecientes al dominio Bacteria.

De acuerdo con la evaluación de la degradación de HAPs por las biopelículas, aunque la cuantificación de la cinética no fue determinada, se obtuvieron crecimientos de las cepas antes mencionadas en presencia de fenantreno, acenafteno y fluoranteno durante la aclimatación alcanzando 200 ppm de cada hidrocarburo.

Finalmente, se cumplieron los objetivos específicos 1 y 3, parcialmente el segundo y obtuvimos información del acarreador Mutag Biochip implementado por primera vez en el tratamiento de HAPs en agua de mar. Por ende, el objetivo general de la tesis “Evaluar el uso de biopelículas para la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua de mar” fue cumplido parcialmente y determinamos recomendaciones para estudios futuros de la biodegradación de HAPs.

Palabras clave: Fenantreno, Acenafteno, Fluoranteno, Agua de mar, Biopelículas.

ABSTRACT

Phenanthrene, acenaphthene and fluoranthene belong to the 16 most dangerous polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the environment according to the USEPA (US Environmental Protection Agency). Its presence in biological organisms and in environmental systems means mutagenic, teratogenic, toxic, endocrine and physicochemical effects, therefore are considered a priority for their rapid elimination. Being the marine ecosystems of commercial and industrial importance for Mexico and the world, these represent the largest hydrocarbon basin, intentionally and unintentionally discharged by anthropogenic and natural sources.

Although, large-scale spills are socially more alarming, are the micro and medium spills that contribute the largest amount of hydrocarbons annually to the oceans. Unlike the different physical methods for the degradation of PAHs, are the microorganisms that play the greatest role in mitigating this type of environmental impacts.

This work consisted in the implementation of a bioremediation system of seawater contaminated with phenanthrene, acenaphthene and fluoranthene (PAHs of greater importance due to their biological effects in marine ecosystems). Therefore, the general objective of this work was to evaluate the use of biofilms for the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater. Phenanthrene is generally used as a model for studies of biodegradation of PAHs. Fluoranthene is one of the most abundant pollutants in the environment and acenaphthene is produced to make dyes, insecticides, fungicides, plastics and pharmaceuticals.

Mutag Biochip is a biofilm carrier that implements the Mobile Bed Biofilm Reactor (MBBR) technology in the biological treatment of wastewater and is based on the immobilization of microorganisms on the active surface of the carrier for them to perform the removal of the elements to degrade. For this study, the carrier was implemented to cultivate microbiological consortia and remove phenanthrene, acenaphthene and fluoranthene in seawater.

Four treatments for the degradation of the aforementioned PAHs were implemented: 1. Biological consortium formed (CB) was a biological consortium of 5 marine bacterial strains previously characterized by their ability to degrade PAHs; 2. Natural Consortium (CN), was a natural consortium of filtered microorganisms of seawater sampled at a local dock; 3. Control 1 (C1) served to determine the volatilization of PAHs in the absence of Mutag Biochip support and 4. Control 2 (C2) served to determine the concentration of PAHs impregnated in Mutag Biochip supports.

The experimental design consisted of three stages. Stage 1. Characterization of the support. Stage 2. Growth of the CB and CN consortia in the presence of phenanthrene, acenaphthene and fluoranthene; and degradation kinetics of PAHs on days 0, 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 14 and 18 implementing the 4 treatments mentioned above. The samples were quadrupled for CB and CN; and for controls C1 and C2 sampling was performed. Stage 3. Characterization and identification of bacterial strains grown in consortia.

It was identified that the 3 strains: A2A, C3C and D2A, belong to the species *Bacillus pumilus*, *Microbacterium keratanolyticum* and *Dietzia aurantiaca*, respectively. While strains L2F and L21 belong to the species *Halomonas* sp. These strains formed the bacterial consortium.

The diversity and abundance percentage of the natural consortium was as follows: *Roseovarius* sp. 29%, *Ruegeria* sp. 2%, *Salipiger* sp. 5%, *Marinobacter* sp. 1%, *Idiomarina* sp. 2%, *Alcanivorax* sp. 6% and *Halomonas* sp. 31% In turn, 15% of the abundance corresponded to bacteria belonging to the phylum Proteobacteria and 5% of the abundance corresponded to species belonging to the Bacteria domain.

According to the evaluation of the degradation of PAHs by biofilms, although the quantification of the kinetics was not determined, growths of the aforementioned strains were obtained in the presence of phenanthrene, acenaphthene and fluoranthene during acclimatization reaching 200 ppm of each hydrocarbon.

Finally, specific objectives 1 and 3 were achieved, partially the second and we obtained information from the Mutag Biochip carrier first implemented in the treatment of PAHs in seawater. Therefore, the general objective of the thesis "Evaluate the use of biofilms for the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater" was partially fulfilled and we determined recommendations for future studies of the biodegradation of PAHs.

Key words: Phenanthrene, Acenaphthene, Fluoranthene, Seawater, Biofilms.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1. Objetivo general	4
2.2. Objetivos específicos	4
3. ANTECEDENTES	5
3.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos	5
3.1.1. HAPs en el ambiente marino	9
3.2. HAPs de interés para este proyecto	15
3.2.1. Acenafteno	15
3.2.2. Fenantreno	15
3.2.3. Fluoranteno	16
3.3. Biopelículas.....	17
3.3.1. Interacción entre especies en una biopelícula	22
3.3.2. Rol de las bacterias como degradadores de HAPs	24
3.3.3. Degradación de HAPs por biopelículas marinas	28
4. MATERIALES Y METODOS.....	30
4.1. Materiales	31
4.1.1. Soporte para biopelículas Mutag BioChip™	31
4.1.2. Hidrocarburos.....	31
4.1.3. Agua de mar	32
4.1.4. Medios.....	32
4.2. Método	33
4.2.1. Caracterización del soporte	33
4.2.1.1. Análisis elemental.	33
4.2.1.2. Microscopía electrónica de barrido.....	33
4.2.2. Formación de biopelículas	34
4.2.2.1. Consorcio natural o silvestre	34
4.2.2.2. Consorcio bacteriano formado	34
4.2.3. Cinética de la degradación de HAPs	36
4.2.4. Método para la cuantificación de HAPs	37

4.2.4.1.	Extracción líquido-líquido	37
4.2.4.2.	Método cromatográfico.....	38
4.2.5.	Cuantificación de microorganismos	38
4.2.6.	Caracterización de las biopelículas.....	38
4.2.6.1.	Extracción de ADN metagenómico.....	39
4.2.6.2.	Secuenciación masiva de microorganismos.....	39
5.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	40
5.1.	Caracterización del soporte	40
5.1.1.	Análisis elemental del soporte	40
5.1.2.	Análisis morfológico del soporte Mutag Biochip™	41
5.2.	Formación de biopelículas en HAPs.....	43
5.2.1.	Consortio natural	43
5.2.2.	Consortio bacteriano formado.....	43
5.3.	Caracterización de biopelículas.....	44
5.3.1.	Identificación de las cepas del consorcio bacteriano formado por biología molecular.....	44
5.3.2.	Identificación por secuenciación	47
5.3.3.	Análisis morfológico por microscopía electrónica de los consorcios.....	48
5.4.	Cinética de degradación.....	50
5.4.1.	Concentración de HAPs por peso.....	52
5.5.	Validación del método de extracción	54
6.	CONCLUSIONES.....	58
7.	RECOMENDACIONES.....	59
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	60

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Valores críticos de referencia de la NOAA para HAPs.	9
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de tres HAPs incluidos en la lista de los 16 HAPs considerados como “sustancias prioritarias peligrosas”	11
Tabla 3. Ventajas ecológicas que aportan las biopelículas como forma de crecimiento.	22
Tabla 4. Lista de organismos halófilos degradadores de HAPs.	26
Tabla 5. Porcentajes obtenidos del análisis elemental por cromatografía del soporte de biopelículas Mutag Biochip™.	40
Tabla 6. Resultados de la secuenciación genómica.	46
Tabla 7. Identificación metagenómica del consorcio natural aclimatado en acenafteno, fenantreno y fluoranteno.	47
Tabla 8. Tabla de los pesos del acenafteno identificados en la cinética de degradación.	52
Tabla 9. Tabla de los pesos del fenantreno identificados en la cinética de degradación.	53
Tabla 10. Tabla de los pesos del fluoranteno identificados en la cinética, soporte, líquido y peso degradado por las biopelículas.	54
Tabla 11. Resultados de recuperaciones de acenafteno, fenantreno y fluoranteno y su RSD con tres niveles diferentes de concentración.	55

LISTA DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Arreglo molecular y regiones metabólicamente activas de los HAPs.	5
Figura 2. Estructuras químicas de los 16 HAPs prioritarios identificados por la USEPA y WFD. Encerrados en rojo los HAPs de interés para este proyecto.	8
Figura 3. Efecto ambiental marino a distintas concentraciones de HAPs totales.	12
Figura 4. Destino de los hidrocarburos en un derrame de petróleo marino.	14
Figura 5. Estructura 2D del acenafteno	15
Figura 6. Estructura 2D del fenantreno.	16
Figura 7. Estructura 2D del fluoranteno.	17
Figura 8. Diagrama conceptual del ciclo de vida de una biopelícula en tres pasos: asentamiento, crecimiento y desprendimiento en grupos o dispersión de células.	19
Figura 9. Representación esquemática de los pasos cíclicos envueltos en la formación de una biopelícula activa.	20
Figura 10. Ruta propuesta para el catabolismo microbiológico de HAPs.	29
Figura 11. Diagrama metodológico del proyecto de tesis.	30
Figura 12. Características del soporte Mutag Biochip™.	31
Figura 13. Punto de recolección de muestras de agua en Progreso.	32

Figura 14. Representación esquemática del dispositivo para la aclimatación en HAPs de los consorcios natural y bacteriano formado.....	35
Figura 15. Representación esquemática del dispositivo experimental para la realización de las cinéticas de degradación de HAPs.....	37
Figura 16. Gráfica del análisis elemental (C, H, N, S) del soporte Mutag Biochip™.	41
Figura 17. Resultados obtenidos de la microscopia electrónica de barrido con diferentes escalas de zoom.	42
Figura 18. Zoom de una región del soporte de x30 a x50 mostrando los diámetros de los poros.....	42
Figura 19. Biopelículas del consorcio natural formado en presencia de la mezcla de HAPs a 200 ppm.	43
Figura 20. Cepa A2A formada en 200 ppm.	44
Figura 21. Cepa C3C formada en 200 ppm.....	44
Figura 22. Cepa D2A formada en 200 ppm.	44
Figura 23. Cepa L2F formada en 200 ppm.....	44
Figura 24. Cepa L21 formada en 200 ppm.	44
Figura 25. Biopelículas del consorcio bacteriano formado de las 5 cepas en presencia de los HAPs a 200 ppm.....	44
Figura 26. Estereoscopía y micrografías al microscopio electrónico de barrido de los consorcios CB4: consorcio formado, a (30 µm), b (20 µm) y c (20 µm).	48
Figura 27. Estereoscopía y micrografías al microscopio electrónico de barrido de los consorcios CN3 consorcio natural, 1 (1 mm), 2 (20 µm) y 3(20 µm).	49
Figura 28. Porcentaje residual de acenafteno, fenantreno y fluoranteno durante la cinética de degradación.....	51
Figura 29. Cristales precipitados (a) y suspendidos en la superficie (b) de los tres HAPs.....	52
Figura 30. Gráfica de barras del porcentaje de recobro de acenafteno, fenantreno y fluoranteno a 1, 50 y 200 ppm.	56

1. INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son compuestos orgánicos que contaminan el ecosistema marino, pues en este ecosistema se extrae, transporta y vierte petróleo, gasolina y diesel por las prácticas de explotación y consumo humano para transporte marítimo-terrestre, principalmente. De hecho, el océano es la mayor cuenca de contaminantes de origen antropogénico, el cual recibe grandes cantidades de productos químicos de fuentes terrestres. La descarga en la costa de compuestos químicos biológicamente activos (ej. petróleo, hidrocarburos, organoclorados y bifenilos) son la principal causa de contaminación marina, siendo los HAPs los contaminantes más letales en las zonas costeras (Mangwani *et al.*, 2015).

Efectivamente, este ecosistema es el último y más grande depósito de hidrocarburos procedentes del petróleo (Varjani, 2017) y ha habido una creciente preocupación por el aumento de las concentraciones en el ecosistema marino (Haritash *et al.*, 2009) especialmente en peces y en crustáceos (de importancia para el consumo humano) donde las concentraciones de HAPs son mucho más altas que del ambiente del cual se extrajeron, esto debido a las características bioacumulativas y biomagnificables de los HAPs (Abdel *et al.*, 2016). Cabe mencionar, que la concentración de los HAPs en el ecosistema marino determina diferentes efectos tóxicos, por ejemplo, trazas de HAPs a 1 ppb pueden afectar el crecimiento del fitoplancton (Bueno *et al.*, 2003).

Por sus características, los HAPs son menos densos que el agua y debido a su limitada solubilidad e hidrofobicidad causa, o que floteen en la superficie o que sean fuertemente adsorbidos por las partículas orgánicas de los sedimentos (Folwell, 2016). Ejemplo de ello, es cuando se presentan derrames de petróleo, estos permanecen en la superficie del agua de mar (Bailey y Bailey, 1998), alterando la actividad fotosintética y la difusión de oxígeno molecular, los cuales son factores que los microorganismos marinos puedan, además de realizar sus actividades biológicas, también degradar estos compuestos por vía aeróbica (Orozco *et al.*, 2003), la cual es la vía más rápida de degradación que la vía anaeróbica.

Los HAPs son compuestos cuya base elemental son el carbón y el hidrogeno unidos en arreglos moleculares (lineal, anular y racimos) cuya estructura principal es el anillo de benceno (anillo de seis carbonos muy estable y difícil de romper). Estos HAPs se caracterizan por ser cancerígenos, citotóxicos, teratogénicos, mutagénicos, inmunosupresores y disruptores endocrinos (estrogénicos o antiestrogénicos). Los HAPs, son los más importantes debido a sus efectos perjudiciales a seres humanos y otros organismos ya que se liberan al medio ambiente de forma natural y por medios antropogénicos (Pothuluri *et al.*, 1994; Stellman, 1998; Arora, 2004; Haritash *et al.*, 2009; Shukla *et al.*, 2014; Abdel *et al.*, 2016; CDC, 2017; Mangwani *et al.*, 2017; Varjani, 2017).

Por ello, los HAPs representan riesgos directos e indirectos a la salud de todas las formas de vida en el planeta. Consecuentemente, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) y la Directiva Marco del Agua de la Unión Europea (WFD), han categorizado 16 HAPs como "sustancias prioritarias peligrosas" que necesitan remediación inmediata (Pothuluri *et al.*, 1994; Stellman, 1998; Arora, 2004; Haritash *et al.*, 2009; Shukla *et al.*, 2014; Abdel *et al.*, 2016; CDC, 2017; Mangwani *et al.*, 2017; Varjani, 2017).

Debido a su importancia, se han establecido diferentes procesos de degradación por métodos físicos, químicos y biológicos. A diferencia de la adsorción, volatilización, fotólisis y la degradación química, la degradación por procesos biológicos representa el mayor proceso de degradación de HAPs. Particularmente, los procesos biológicos utilizan el potencial de los organismos (bioremediación) para mineralizar xenobióticos (como los HAPs) a productos solubles como H₂O, CO₂ (aerobio) o CH₄ (anaerobio) y hacerlos menos tóxicos (Singh *et al.*, 2006; Passarini *et al.*, 2011; Ukiwe *et al.*, 2013; Shukla *et al.*, 2014; Mangwani *et al.*, 2017; Varjani, 2017).

Entre los procesos de degradación biológica de HAPs, se encuentran las biopelículas, los cuales también han sido caracterizadas por su habilidad degradadora de otros compuestos xenobióticos como plaguicidas, clorofenoles, colorantes, herbicidas, etc. y principalmente compuestos aromáticos policíclicos (Singh *et al.*, 2006). Las biopelículas son comunidades polimicrobianas funcionalmente organizadas

embebidas en una matriz extracelular producida por ellas mismas, la cual comprende una compleja mezcla de polisacáridos, lípidos, proteínas y ADN extracelular (ADNe). Dicha matriz, protege a los microorganismos del estrés ambiental, de la exposición a antibióticos y del ataque inmune, también permite a estas comunidades adherirse a superficies solidas vivas o inertes (Betancourth *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2006; Siqueira *et al.*, 2011; Vacca, 2017).

Entre las ventajas de utilizar biopelículas para bioremediación, están que sus procesos pueden generarse natural o antropogénicamente, poseen cualidades magníficas para eliminar elementos contaminantes del ambiente como los HAPs, no requirieren energía extra para trabajar, no generan desechos tóxicos en sus procesos de biodegradación, son relativamente económicas, fáciles de manejar y son una opción segura y rentable (Pothuluri *et al.*, 1994; Betancourth *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2006; Haritash *et al.*, 2009; Passarini *et al.*, 2011; Shukla *et al.*, 2014; Mangwani *et al.*, 2017; Varjani, 2017). Por ello, el aporte científico de este trabajo es evaluar los consorcios microbianos como degradadores de HAPs.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar el uso de biopelículas para la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua de mar.

2.2. Objetivos específicos

1. Seleccionar microorganismos degradadores de HAPs para la formación de biopelículas.
2. Evaluar la degradación de HAPs por las biopelículas formadas.
3. Analizar la diversidad y abundancia de microorganismos formadores de la biopelícula.

3. ANTECEDENTES

3.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son compuestos elementalmente formados de carbón e hidrogeno. La estructura principal de los HAPs son tres o más anillos de benceno. Cada anillo está formado por seis carbonos los cuales se encuentran en resonancia y ligados cíclicamente, lo cual le confiere a esta estructura resistente a la degradación por su alta estabilidad. A su vez, los anillos de benceno se pueden unir en arreglos moleculares, que pueden ser lineales, racimos y angulares, los cuales pueden presentar en su estructura regiones A, B, Bahía, K y L (Figura 1) los cuales son sitios altamente activos de importancia toxica. Estas regiones cuando experimentan metabolismo, producen epóxidos altamente reactivos (más tóxicos que el compuesto parental) agravando el problema. Ejemplo son los epóxidos secundarios del Benzo(a)pireno, los dihidrodiolepóxidos, los cuales son altamente inestables reaccionando con el ADN especialmente la guanidina iniciando el proceso mutagénico (Stellman, 1998; Mastandrea *et al.*, 2005; Shukla *et al.*, 2014; Abdel y Mansour 2016; Varjani, 2017; Zafra *et al.*, 2017).

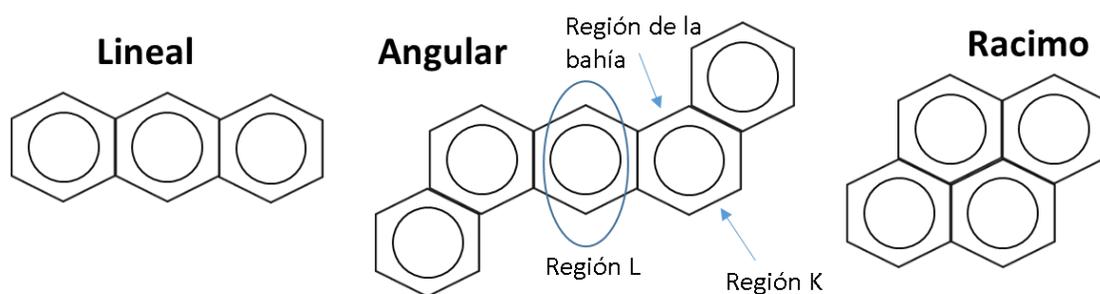


Figura 1. Arreglo molecular y regiones metabólicamente activas de los HAPs (modificado de Shukla *et al.*, 2014; Abdel.Shaffy y Mansour, 2016) editado con Chem3D versión 15.0.0.106.

Los HAPs son un grupo de sustancias químicas que se forman durante la incineración (pirólisis) incompleta de moléculas orgánicas los cuales forman fragmentos de moléculas y radicales que se combinan para formar los HAPs. La combustión incompleta a altas temperaturas (500-800°C) o la sujeción de material orgánico a bajas temperaturas (100-300°C) por periodos largos, los forman. Los HAPs se forman por la

combustión de combustibles fósiles como el petróleo, el gas, el carbón y la gasolina (Pothuluri y Cerniglia, 1994; Stellman, 1998; Haritash y Kaushik, 2009).

Las características generales de los HAPs son altos puntos de fundición-ebullición, bajo presión de vapor y baja solubilidad acuosa. La solubilidad acuosa disminuye por cada anillo adicional que contenga el HAP. Sin embargo, son altamente lipofílicos (solubles) en solventes orgánicos (Haritash y Kaushik, 2009; Abdel y Mansour, 2016), acetona y otros hidrocarburos. Poseen sensibilidad a la luz, resistencia al calor, conductividad, habilidad de emisión, resistencia a la corrosión y acción fisiológica. Poseen espectros específicos de absorbanza de UV (emiten específicas longitudes de onda de luz cuando son excitados) lo cual es útil en su identificación y además de conferirles fluorescencia (Abdel y Mansour, 2016). Existen más de 100 clases diferentes de HAPs que en sus formas químicas puras son principalmente sólidos, incoloros, blancos o verde-amarillosos pálidos y tienen un olor leve y agradable (Abdel y Mansour, 2016; CDC, 2017).

Los HAPs exhiben una naturaleza recalcitrante porque son de muy baja solubilidad en agua, configurándolos como compuestos típicamente microcontaminantes orgánicos y con capacidad bioacumulativa. Por lo general, el peso molecular y el número de anillos en su estructura es inversamente proporcional a la solubilidad en agua y a la volatilidad de los HAPs. Por ello, la solubilidad en agua, los HAPs de menor peso molecular tienden a ser las más solubles (Orozco *et al.*, 2003; Ukiwe *et al.*, 2013).

Son mayormente usados como intermediarios en farmacéutica, productos fotográficos, plásticos termoendurecibles, materiales lubricantes, plásticos, plaguicidas, asfalto que se utilizan en la construcción de carreteras y otras industrias químicas. Los usos generales de algunos HAPs son (Abdel y Mansour, 2016):

- Acenafteno: fabricación de pigmentos, colorantes, plásticos, plaguicidas, farmacéutica y fungicidas (Carrillo, 2009; Abdel y Mansour, 2016).
- Fluoranteno: fabricación de agroquímicos, colorantes y en farmacéutica (Abdel y Mansour, 2016), revestimiento para proteger el interior de las tuberías de agua potable de acero y hierro dúctil y los tanques de almacenamiento (Mastandrea *et al.*, 2005).

- Fenantreno: fabricación de resinas, plaguicidas, fungicidas, detergentes, tintes, (Gutiérrez, 2014; Abdel y Mansour, 2016) explosivos, en la investigación clínica y en la síntesis de fármacos (Mastandrea *et al.*, 2005).

Son objeto de gran atención por ser cancerígenos (Stellman, 1998; Haritash y Kaushik, 2009; Folwell *et al.*, 2016; CDC, 2017; Varjani, 2017), teratogénicos (Varjani, 2017), tóxicos (Haritash y Kaushik, 2009; Passarini *et al.*, 2011) mutagénicos (Pothuluri y Cerniglia, 1994; Haritash y Kaushik, 2009), potentes inmunosupresores (Abdel y Mansour, 2016), producir efectos neurotóxicos y producir efectos estrogénicos o antiestrogénicos (son disruptores endocrinos) (Arora, 2004). Estos efectos tóxicos se refieren tanto a la vida vegetal (asfixia de algas y líquenes) como animal (toxicidad en peces y aves acuáticas) extendiéndose hasta el hombre, por acumulación en la cadena trófica acuática (Orozco *et al.*, 2003). Por ello, son de importancia directa e indirecta para la economía y la salud humana.

Los HAPs más simples que tienen capacidad carcinogénica, según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer son el fenantreno y el antraceno los cuales contienen tres anillos aromáticos (Stellman, 1998; Shukla *et al.*, 2014; Abdel y Mansour 2016; Varjani, 2017; Zafra *et al.*, 2017) de hecho el fenantreno es utilizado como estructura predilecta para ensayos relacionados al cancer y el Benzo(a)pireno (BaP) como elemento de referencia en diferentes estudios ambientales (Mastandrea *et al.*, 2005).

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) y el Directiva Marco del Agua (WFD) de la Comisión Europea enumeraron 16 HAPs como contaminantes prioritarios de remediación inmediata (Figura 2) (Habe y Omori, 2003; Shukla *et al.*, 2014; Folwell *et al.*, 2016; WFD, 2017). La omnipresente presencia de HAPs representa un riesgo evidente ya que son el mayor grupo de contaminantes, debido a su impacto a la salud, al ambiente y a todas las formas de vida en el planeta tierra. Muchos factores bióticos y abióticos como volatilización, bioacumulación, fotooxidación y transformación microbiana están asociados con la toxicidad de los HAPs para el medio ambiente (Shukla *et al.*, 2014).

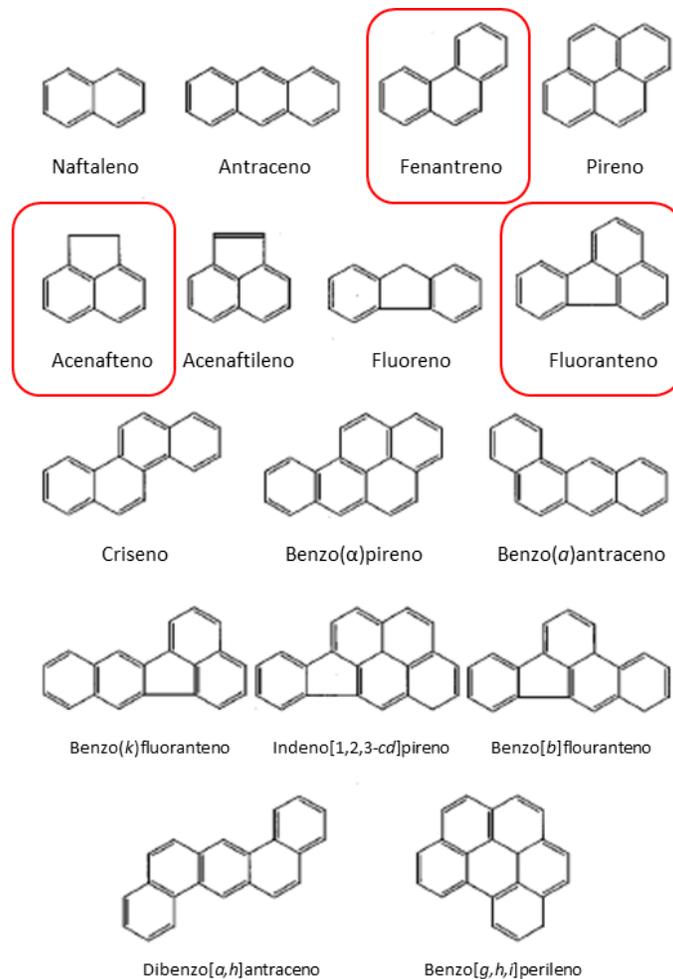


Figura 2. Estructuras químicas de los 16 HAPs prioritarios identificados por la US EPA y WFD. Encerrados en rojo los HAPs de interés para este proyecto (Modificado de Habe y Omori, 2003).

Los HAPs están comúnmente liberados al aire, suelo, sedimentos y agua. Pueden ser de origen biológico-natural o de origen antropogénico. Por ejemplo, los HAPs de origen natural proceden de productos de combustión incompleta de fuentes orgánicas, emisiones al aire de los volcanes, incendios forestales, en sustancias como petróleo crudo, carbón, alquitrán o brea, creosota y están adheridas en partículas del polvo o como sólidos en el suelo o en los sedimentos, mientras que en las fuentes antropogénicas están presentes en derrames de petróleo en el océano, almacenamiento subterráneo, fugas de tanques almacenados sobre el suelo, fugas de gasolina y/o diésel, centrales eléctricas, emisiones de automóviles, asfalto utilizado en el recubrimiento de carreteras, recubrimiento de techos, humo de cigarro, aceites

lubricantes, filtros de aceite, incineración de desechos sólidos municipales, plásticos, pesticidas, medicinas, carne asada al carbón y en la leche de vaca o leche humana contaminada (Pothuluri y Cerniglia, 1994; Stellman, 1998; Haritash y Kaushik, 2009; Simister *et al.*, 2015; Abdel y Mansour, 2016; CDC, 2017; Varjani, 2017).

3.1.1. HAPs en el ambiente marino

Si bien, la aportación de HAPs al medio marino ocurre por fuentes naturales, han ocurrido grandes derrames de petróleo causados por accidentes de buques tanque, o derrames en el fondo marino; como el sucedido el 20 de abril de 2010 por la plataforma petrolífera BP Deepwater Horizon, considerado el mayor derrame de petróleo en el Golfo de México, donde se derramaron más de 779 millones de litros de petróleo. Sin embargo, representa una pequeña fracción de los 1.3 millones de toneladas de petróleo que se liberan en los océanos cada año a través de descargas accidentales o deliberadas de tanques de sitios de procesamiento (Lorenzo, 2006; Atlas y Hazen, 2011).

Los HAPs pueden encontrarse con frecuencia en el agua y en el sedimento marino (debido a su salinidad los hidrocarburos tienen una solubilidad en agua de mar del orden del 75 % con respecto al valor en agua pura) (Orozco *et al.*, 2003). El sedimento marino constituye un componente importante en los sistemas acuáticos ya que proporciona hábitat, sitio de protección y eclosión para muchos organismos acuáticos benthicos tales como camarones y ostiones, por lo que es importante que este ambiente esté libre de contaminantes, especialmente de hidrocarburos (Carrillo, 2009).

Tabla 1. Valores críticos de referencia de la NOAA para HAPs (Nahuat, 2006; Carrillo, 2009).

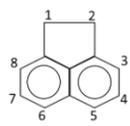
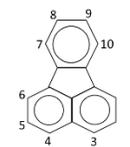
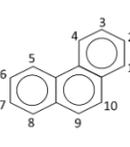
HAP	Límite NOAA en AGUA ($\mu\text{g/L}$)	Límite NOAA en SEDIMENTO		
		TEL: nivel de umbral de efectos ($\mu\text{g/g}$)	ERL: intervalo efecto bajo ($\mu\text{g/g}$)	PEL: nivel probable de efectos ($\mu\text{g/g}$)
Fluoranteno	0.04	0.112	0.6	1.493
Acenafteno	0.97	0.006	0.016	0.088
Fenantreno	0.30	0.086	-	0.543

Por otra parte, al comparar la solubilidad de diferentes tipos de hidrocarburos con el tamaño molecular, el orden de mayor a menor solubilidad, es habitualmente: aromático>ciclo alcano>alcano ramificado>n-alcano (Orozco *et al.*, 2003). Por ello, la Administración Nacional Oceánica y Atmosférica (NOAA, en inglés) ha establecido los límites de varios HAPs individuales en aguas y sedimentos (Tabla 1) de tal manera que estos límites sean un indicador acerca de la calidad de estos ambientes (Carrillo, 2009).

Los HAPs producen una acusada toxicidad sobre los organismos acuáticos. Como regla general, el mayor peso molecular y los mayores valores del log K_{ow} del hidrocarburo incrementan su toxicidad (Orozco *et al.*, 2003). Está comprobado que su toxicidad es proporcional al peso molecular (Carrillo, 2009). Casi todos los HAPs son sospechosos de ser carcinogénicos en algún grado en peces y animales (Pothuluri y Cerniglia, 1994; Orozco *et al.*, 2003). De hecho, varios autores reportan los efectos de la concentración letal media de los HAPs en peces (Orozco *et al.*, 2003; Widdowson *et al.*, 2005; Salazar, 2008; Carrillo, 2009). Los valores de la concentración letal en peces (ensayo de 96 horas, CL_{50}) de los tres hidrocarburos de interés para este proyecto se muestran en la Tabla 2.

En la Figura 3 se muestran los diferentes efectos biológicos de las concentraciones de los HAPs totales en el medio marino. Efectivamente, este ecosistema es el último y más grande depósito de hidrocarburos procedentes del petróleo (Varjani, 2017) y ha habido una creciente preocupación por la creciente concentración de HAPs en el medio (Haritash *et al.*, 2009) especialmente porque las concentraciones de HAPs encontradas en peces y en crustáceos (de importancia para el consumo humano) se esperan que sean mucho más altas que en el ambiente del cual se extrajeron, principalmente debido a las características bioacumulativas y biomagnificables de los HAPs (Abdel *et al.*, 2016).

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de tres HAPs incluidos en la lista de los 16 HAPs considerados como “sustancias prioritarias peligrosas”

HAP	Estructura	Formula química	Peso molecular	Solubilidad en agua mg/L	log Kow	*CL ₅₀ ppm	**NOAA µg/l	***Biodegradación
Acenafteno		C ₁₂ H ₁₀	154	3.93	4.07	0.6-3	0.97	18.77
Fluoranteno		C ₁₆ H ₁₀	202	0.26	5.33	0.11	0.04	191.4
Fenantreno		C ₁₄ H ₁₀	174	1.29	4.46	0.04-0.6	0.3	14.97

*CL₅₀ concentración letal en peces (ensayo de 96 h)
 **Vida media estimada en días
 ***NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration) límite en agua
 Fuente: Orozco *et al.*, 2003; Widdowson *et al.*, 2005; Nahuat, 2006; Salazar, 2008; Carrillo, 2009; Ayil, 2015; Ghosal *et al.*, 2016; NCBI-Phenanthrene, 2017; NCBI-Acenaphthene, 2017; NCBI-Fluoranthene 2017.

Por sus características los HAPs son menos densos que el agua y debido a su limitada solubilidad causa que floten en la superficie o que sean fuertemente adsorbidos por las partículas orgánicas de los sedimentos (Folwell, 2016). Cuando se presentan derrames de petróleo (Figura 4), estos permanecen en gran medida en la superficie del agua de mar (Bailey y Bailey, 1998), el cual (1) forman una película superficial que disminuye la transmisión de luz (alteración de la actividad fotosintética) y la difusión del oxígeno molecular; (2) sus componentes pueden ocasionar efectos tóxicos y (3) son compuestos orgánicos que requieren consumo de oxígeno para su degradación, por lo que disminuyen considerablemente las concentraciones de oxígeno disuelto de las aguas (Orozco *et al.*, 2003) y se reduce la tasa de degradación. Debido a su biomagnificación los HAPs causan extensivos y permanentes daños a los ecosistemas (Varjani, 2017). Por ello, los HAPs, causan serios daños sociales, económicos y ambientales (Passarini *et al.*, 2011).

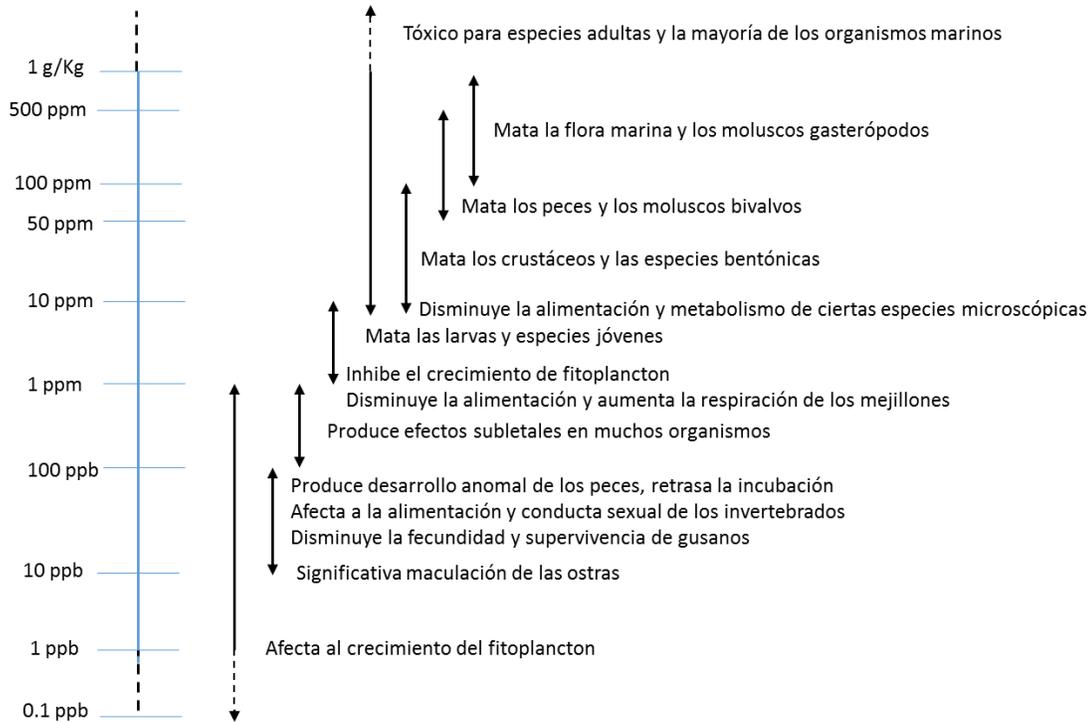


Figura 3. Efecto ambiental marino a distintas concentraciones de HAPs totales. (modificado de Bueno *et al.*, 2003).

En la superficie del mar, las manchas de aceite liberadas accidentalmente por petroleros o plataformas marinas se ven afectada por la acción de los vientos, las olas, las corrientes del agua, el tipo de aceite, la temperatura y la radiación solar (Figura 4). Estos factores ayudan a la volatilización de principalmente hidrocarburos de bajo peso molecular (alcanos y los hidrocarburos monoaromáticos). De hecho, se logra degradar entre el 20 al 50% de la masa total del vertido por volatilización. Sin embargo, las fracciones volátiles se mueven a la atmósfera donde los HAPs pueden transportarse lejos y volver a caer a la superficie. Los factores antes mencionados, también ayudan a que el aceite derramado se rompa en gotitas y se disperse a través de la columna de agua, lo que mejora la biodegradación de los hidrocarburos y la disolución de las fracciones de aceite solubles en agua, también pueden formar plumas de HAPs en la columna de agua por las corrientes marinas, o pueden llegar a la superficie del mar y finalmente, a la zona costera. En este caso, procesos como (1) el rociado de agua a alta presión, (2) la aplicación de materiales absorbentes (3) eliminación de la arena contaminada y (4) el tratamiento *ex situ*, pueden servir para remediar las playas

contaminadas. Los fenómenos naturales de atenuación y dispersión en la columna de agua y la volatilización en la atmósfera contribuyen adicionalmente a la eliminación de HAPs (Orozco *et al.*, 2003; McGenity *et al.*, 2012; Mapelli *et al.*, 2017).

Los vientos y la radiación solar, permiten la fotooxidación, proceso mediante el cual, los HAPs, reaccionan con el oxígeno y la luz solar, dando lugar a cambios estructurales que pueden conducir a una mayor solubilidad en el agua o, por el contrario, a una mayor recalcitrancia a la biodegradación. Sin embargo, en presencia de mares turbulentos las gotas de agua se suspenden en el aceite, dando como resultado emulsiones de agua en aceite, también conocidas como mousse de chocolate, que es difícil de degradar debido a su alta viscosidad y área superficial reducida. En este caso, los dispersantes pueden ser útiles para disminuir el tamaño de las gotas de aceite y aumentar la relación superficie-volumen. Un método para tratar derrames es la quema *in situ* el cual puede potenciar la acumulación de residuos sólidos (por ejemplo, bolas de alquitrán) que pueden hundirse y por lo tanto sedimentarse, la sedimentación generalmente solo ocurrirá cuando el aceite se adsorba a las partículas debido a que casi todos los crudos tienen una densidad menor que el agua de mar (Figura 4) (Orozco *et al.*, 2003; McGenity *et al.*, 2012; Mapelli *et al.*, 2017).

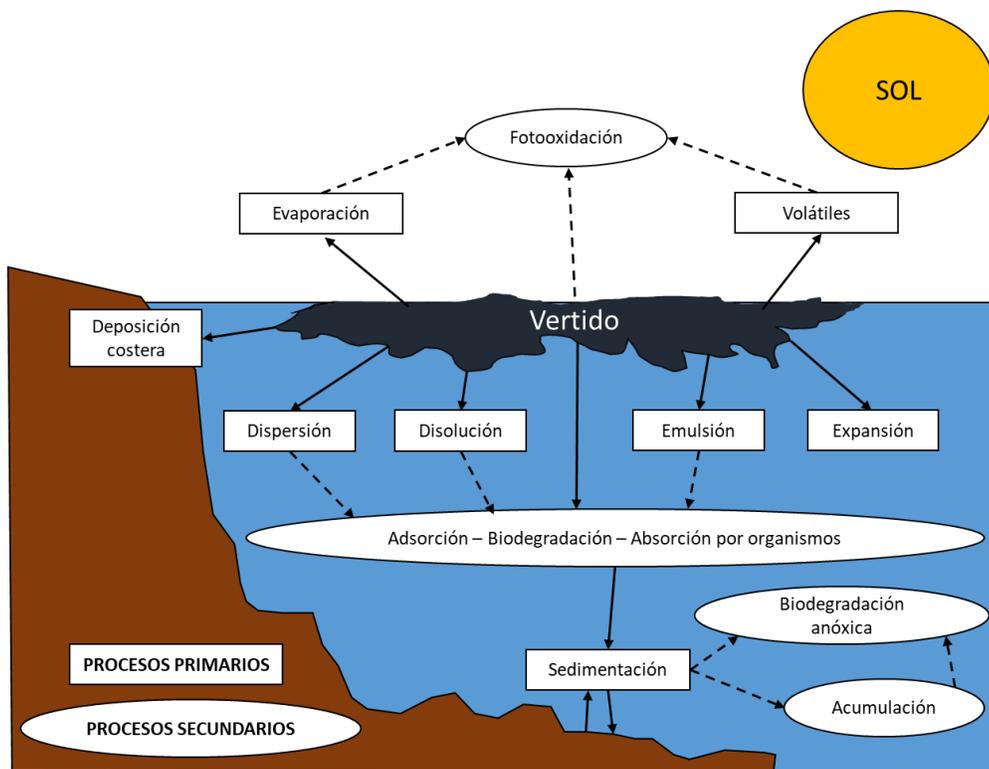


Figura 4. Destino de los hidrocarburos en un derrame de petróleo marino (modificado de Orozco *et al.*, 2003; McGenity *et al.*, 2012).

Debido a su importancia, se han establecido diferentes procesos de degradación de los HAPs por medios físicos, químicos y biológicos, como los mencionados anteriormente. A diferencia de la adsorción, volatilización, fotólisis y degradación química, la degradación por procesos biológicos (bioremediación) representa el mayor proceso de degradación de HAPs. Particularmente, los procesos biológicos utilizan el potencial de los organismos, los cuales permiten mineralizar xenobióticos como los HAPs a productos solubles como H_2O , CO_2 (aerobio) o CH_4 (anaerobio) y hacerlos menos tóxicos (Singh *et al.*, 2006; Passarini *et al.*, 2011; Ukiwe *et al.*, 2013; Shukla *et al.*, 2014; Mangwani *et al.*, 2017; Varjani, 2017).

3.2. HAPs de interés para este proyecto

3.2.1. Acenafteno

Acenafteno (Figura 5): Fórmula general $C_{12}H_{10}$; Peso molecular 154.2 g/mol. Punto de ebullición: 279 °C. Punto de fusión: 95 °C. Densidad: 1.2 g/cm³. Es muy tóxico para los organismos acuáticos (Ayil, 2015).

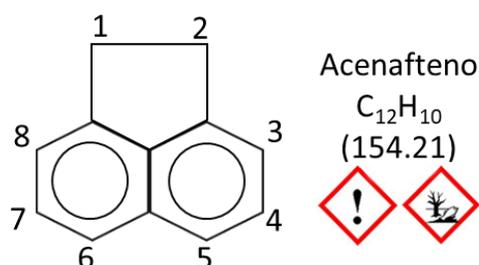


Figura 5. Estructura 2D del Acenafteno (Modificado de Pothuluri y Cerniglia, 1994; NCBI-Acenaphthene, 2017).

Clasificación GHS: H319 (87.65 %): Provoca irritación ocular grave [Advertencia: Lesiones oculares graves / irritación ocular - Categoría 2A]. H400 (92.59 %): Muy tóxico para la vida acuática [Advertencia: Peligroso para el medio ambiente acuático, peligro agudo - Categoría 1]. H410 (91.36 %): Muy tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos [Advertencia: Peligroso para el medio ambiente acuático, peligro a largo plazo - Categoría 1] (NCBI-Acenaphthene, 2017).

3.2.2. Fenantreno

El fenantreno (Figura 6) es un HAP de tres anillos de benceno, orientados en forma angular, enlistado en los 16 HAPs contaminantes peligrosos prioritarios (Gutiérrez, 2014; García, 2016; García *et al.*, 2016). Fórmula general $C_{14}H_{10}$. Peso molecular: 178.234 g/mol (NCBI-Phenanthrene, 2017). Está ampliamente distribuido en los ambientes acuáticos y se ha identificado en aguas superficiales, subterráneas, potables, residuales y en sedimentos de lagos, así como en mariscos recolectados de aguas contaminadas (Gutiérrez, 2014). Está dentro de los HAPs de bajo peso molecular que se encuentran ampliamente presentes en el ambiente y es usado como un indicador de contaminación por excelencia. Como fenantreno representa el más pequeño de los HAPs con ambas regiones (región Bahía y región K) es usado como

un modelo sustrato para estudios de metabolismo carcinogénico de HAPs (Ghosal *et al.*, 2016).

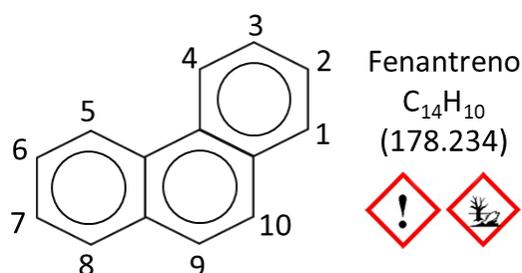


Figura 6. Estructura 2D del Fenantreno (Modificado de Pothuluri y Cerniglia, 1994; NCBI-Phenanthrene, 2017).

Clasificación GHS: H302 (99.55 %): Nocivo por ingestión [Advertencia: Toxicidad aguda, oral - Categoría 4]. H400 (18.82 %): Muy tóxico para la vida acuática [Advertencia: Peligroso para el medio ambiente acuático, peligro agudo - Categoría 1]. H410 (17.91 %): Muy tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos [Advertencia: Peligroso para el medio ambiente acuático, peligro a largo plazo - Categoría 1] (NCBI-Phenanthrene, 2017).

3.2.3. Fluoranteno

El fluoranteno (Figura 7) está formado por cuatro anillos bencénicos. También es conocido como Benceno (j.k) fluoreno. Fórmula general $C_{16}H_{10}$; Peso molecular 202.2 g/mol. Punto de fusión: 19 °C. Peligrosa para el medio ambiente en general porque a lo largo de la cadena alimenticia de interés para el humano, se produce bioacumulación en los gases (Ayil, 2015). Fluoranteno, ocurre naturalmente en combustibles fósiles no alterados. Fluoranteno es consistentemente el más abundante de los HAPs medidos en muestras ambientales y ha sido reportado por ser citotóxico, ampliamente mutagénico y potencialmente carcinogénico (Pothuluri y Cerniglia, 1994).

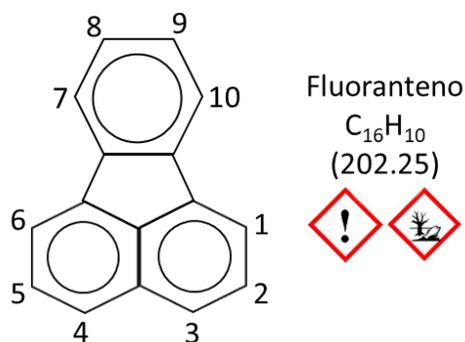


Figura 7. Estructura 2D del Fluoranteno (Modificado de Pothuluri y Cerniglia, 1994; NCBI-Fluoranthene, 2017).

Clasificación GHS: H302 (97.59 %): Nocivo por ingestión [Advertencia: Toxicidad aguda, oral - Categoría 4]. H400 (48.19 %): Muy tóxico para la vida acuática [Advertencia: Peligroso para el medio ambiente acuático, peligro agudo - Categoría 1]. H410 (46.99 %): Muy tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos [Advertencia: Peligroso para el medio ambiente acuático, peligro a largo plazo - Categoría 1] (NCBI-Fluoranthene, 2017).

3.3. Biopelículas

En la naturaleza, la fase de biopelícula es el estilo de vida predominante de los microorganismos (Shukla *et al.*, 2014) y se sabe que varios factores influyen en el desarrollo de la biopelícula, incluida la temperatura, los nutrientes, el régimen hidráulico, las características del sustrato y diversas interacciones ecológicas entre microorganismos en las biopelículas (Siqueira *et al.*, 2011). Las biopelículas son muy comunes en ambientes como en aguas naturales, suelos, tejidos vivos, prótesis humanas (biopelículas médicas) y sistemas de distribución de agua industrial o potable, en donde representan una amenaza para la salud ya que las biopelículas juegan un papel importante en la acumulación, protección y diseminación de patógenos (Siqueira *et al.*, 2011; Siqueira *et al.*, 2013; Shukla *et al.*, 2014).

Sin embargo, en el área de la bioremediación, las biopelículas tienen cualidades interesantes para eliminar elementos contaminantes del ambiente, como el no requerir de energía extra para trabajar, no generar en sus procesos de biodegradación desechos tóxicos, ser relativamente económicas y fáciles de manejar, de manera que

muchos procesos se pueden dar de manera natural o ser impulsados por el hombre (Betancourth *et al.*, 2004). Por ejemplo, las biopelículas son rentables y tienen un gran potencial para la biorremediación de HAPs o xenobióticos (Shukla 2014; Mangwani *et al.*, 2017).

Consecuentemente, el Centro Especializado de la NASA para la Investigación y la Capacitación en el Sostén Avanzado de la Vida (NSCORT) buscaran durante los próximos años crear un modelo de ambiente autosustentable desarrollando hábitats “biorregenerativos” en los cuales los productos derivados de un sistema sean utilizados y procesados por otro. Para lograr esto, trabajan con biopelículas que tratan y limpian el aire y el “agua gris”, es decir, el agua utilizada para bañarse y limpiar el hogar. Las biopelículas crecen en las superficies plásticas a través de las cuales pasa el agua y el aire, de modo que la creación de este ambiente bioregenerativo no está muy lejos de lograrse (Betancourth *et al.*, 2004).

Por definición, las biopelículas son comunidades polimicrobianas funcionalmente organizadas embebidas en una matriz extracelular producida por ellas mismas, la cual comprende una compleja mezcla de polisacáridos, lípidos, proteínas y ADN extracelular (ADNe). Dicha matriz, protege a los microorganismos del estrés ambiental, la exposición a antibióticos y al ataque inmune, así como también permite a estas comunidades adherirse a superficies sólidas vivas o inertes en donde proliferar (Figura 9) (Rittmann y McCarty, 2001; Betancourth *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2006; Siqueira *et al.*, 2011; Vacca, 2017). Aproximadamente 97 % de la matriz de la biopelícula es agua, el cual está ligado a las capsulas de las células microbianas o solventes. Las propiedades físicas de las cuales (tales como viscosidad) son determinadas por los solutos disueltos en él (Singh *et al.*, 2006).



Figura 8. Diagrama conceptual del ciclo de vida de una biopelícula en tres pasos: asentamiento, crecimiento y desprendimiento en grupos o dispersión de células. Center for Biofilm Engineering (modificado de Jiménez 2009).

Una vez que las bacterias están irreversiblemente unidas a la superficie, comienza el proceso de maduración de la biopelícula. La densidad total y la complejidad de la biopelícula aumentan, así como los microorganismos comienzan a replicarse activamente y a morir. Los componentes extracelulares generados interactúan con moléculas orgánicas e inorgánicas formando el glicocálix. En este punto, la biopelícula alcanza una masa crítica y un equilibrio dinámico en el cual se comienzan a producir células planctónicas en la capa más externa. Estos organismos pueden escapar de la biopelícula y colonizar otras superficies (Figura 8) (Jiménez, 2009).

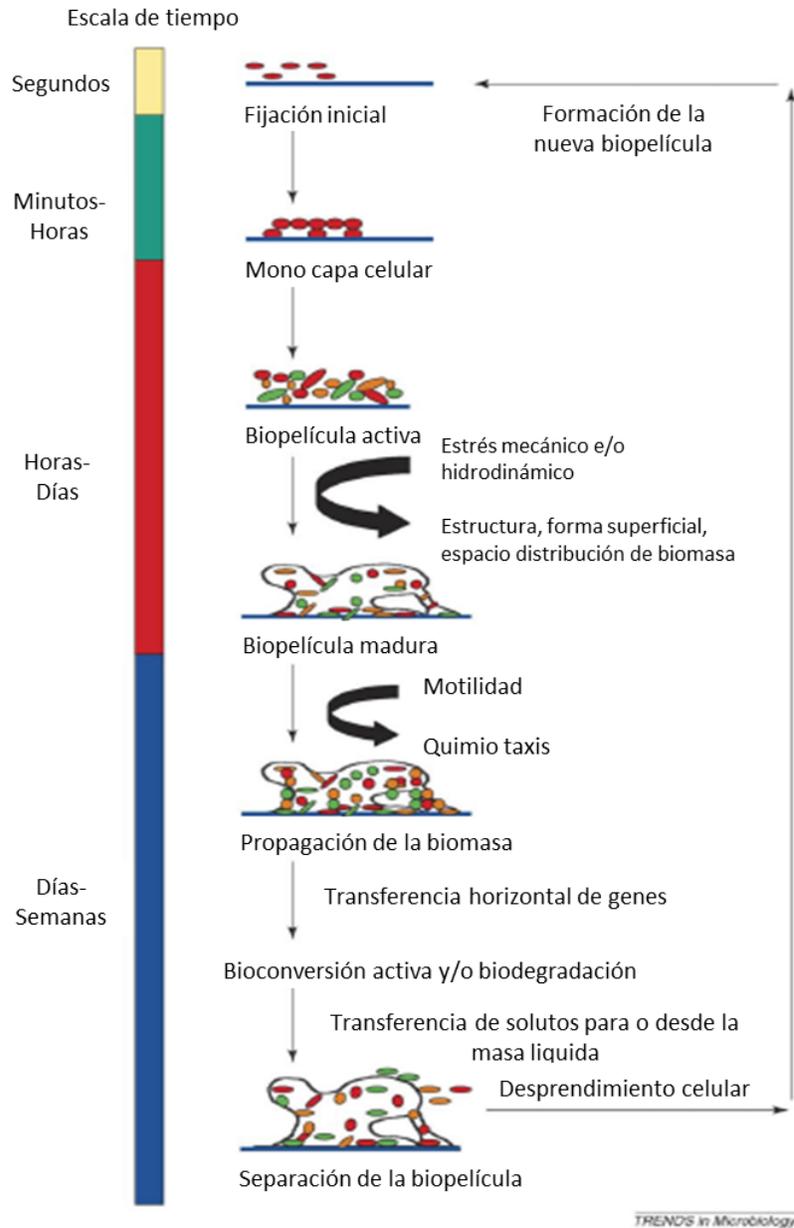


Figura 9. Representación esquemática de los pasos cíclicos envueltos en la formación de una biopelícula activa (Modificado de Singh *et al.*, 2006).

Las células se unen inicialmente mediante interacciones físico-químicas o secreción de proteínas de la matriz extracelular para formar una monocapa celular, en la que las células expresan pili y tienen motilidad espasmódica y la capacidad de experimentar quimiotaxis. Las células proliferan en la monocapa y otros microbios se unen para formar una biopelícula activa, cuyo desarrollo y distorsión están influenciados por factores ambientales tales como el estrés hidrodinámico y mecánico. Las células en la

biopelícula maduran, se vuelven móviles y se someten a quimiotaxis, lo que conduce a la propagación de la biomasa y un aumento de la tasa de transferencia horizontal de genes. A medida que las células mueren, la bioconversión activa y la biodegradación conduce a la transferencia del soluto hacia o desde el líquido, lo que da como resultado un eventual desprendimiento de la biopelícula. Los procesos de formación y desprendimiento de células se repiten en un ciclo, permitiendo de este modo el desarrollo de biopelículas similares, que posteriormente pueden colonizar y alcanzar nuevas dimensiones como resultado de influencias ambientales. El período de tiempo aproximado para el cual persiste cada una de las fases se muestra a la izquierda de la Figura 9 (Singh *et al.*, 2006).

Las características de las biopelículas son las siguientes: 1. Adherencia. 2. Heterogeneidad. 3. Diferentes microambientes (pH, tensión O₂, concentración de iones, carbono, nitrógeno). 4. Sistema circulatorio primitivo. 5. Resistente a las defensas del hospedero, agentes antimicrobianos y detergentes. 6. Quorum sensing (habilidad de los microorganismos para comunicarse y coordinar el comportamiento a través de señales moleculares) (Betancourth *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2006).

Según Rittmann y McCarty (2001), las características de las biopelículas son: 1. Las biopelículas, fijadas en el espacio, continuamente están expuestas al fresco sustrato debido a la advección de sustrato más allá de la biopelícula. 2. Diferentes cepas de bacterias viven en consorcios obligados para el transporte de sustratos o algunas otras relaciones sinérgicas; la yuxtaposición cercana de las células en una biopelícula es necesaria para los cambios. 3. Las biopelículas crean un ambiente interno (ej. pH, O₂ o productos) que tiene condiciones más adecuadas que el líquido suspendido (microambiente). 4. La superficie por sí misma crea un único microambiente. 5. La superficie dispara un cambio fisiológico en la bacteria. 6. La firme estructura del agregado de células altera la fisiología de las células. Las ventajas ecológicas de las biopelículas se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Ventajas ecológicas que aportan las biopelículas como forma de crecimiento (Modificado de Jiménez, 2009; Flemming, 1991).

Función	Relevancia
Adhesión a superficies	Colonización primaria
Agregación de células, formación de gránulos y biopelículas	Inmovilización de las células Alta densidad celular
Sustancias exopoliméricas como elemento estructural	Estabilidad mecánica Desarrollo de microconsorcios Concentración de gradientes Retención de enzimas extracelulares Interacción entre exoenzimas y polisacáridos Previene la pérdida de componentes por lisis celular Transporte de masa a través de los canales Facilidad para la transferencia horizontal de genes Intercambio de señales moleculares Barrera a la transmisión de la luz en zonas profundas de la biopelícula
Barrera protectora	Tolerancia a biocidas, toxinas y metales Protección contra fagocitosis Protección contra algunas especies depredadoras
Propiedades de absorción y adsorción	Acumulación de nutrientes Retención de agua, protección contra la desecación Acumulación de contaminantes en el sedimento

3.3.1. Interacción entre especies en una biopelícula

Todas las superficies, animadas o inanimadas, sumergidas en agua de mar son cubiertas con una delgada capa de biopelícula. Esta capa es altamente compleja, dinámica y rica en señales moleculares producidas por bacterias marinas y diatomeas, los cuales pueden directamente controlar el asentamiento y el subsecuente crecimiento de invertebrados marinos. Desde que las bacterias en la biopelícula son una importante fuente de señales moleculares, estos juegan un papel regulatorio en los patrones de reclutamiento y dinámica poblacional de organismos marinos (Li y Pei, 2005).

La composición de la biopelícula puede ser muy variada (biomoléculas, microalgas, hongos, protozoarios y bacterias). De hecho, en el ambiente marino, en un 1 mm³ de agua superficial, equivale aproximadamente al tamaño de una semilla de amapola, contiene ~600 bacterias, 150 cianobacterias, 9 pequeñas algas, <1 protozoario y ~10,000 virus. Numerosas investigaciones ecofisiológicas revelaron una red de interacciones directas e indirectas dentro y entre especies en agua de mar que son vitales para el mantener el lazo que impulsa los ciclos biogeoquímicos marinos (Singh *et al.*, 2006; Jiménez, 2009; McGenity *et al.*, 2012).

Siendo las bacterias los microorganismos dominantes en la mayoría de las biopelículas consecuentemente, las propiedades de éstas también son las que más predominan (Jiménez, 2009; Varjani, 2017). Debido a las estrechas y mutuamente beneficiosas interacciones físicas y fisiológicas entre organismos en las biopelículas, se puede acelerar el uso de xenobióticos (Singh *et al.*, 2006). Algunos procesos tal como la mineralización de algunos compuestos xenobióticos contaminantes, solo pueden ser llevados a cabo por comunidades microbianas (Jiménez, 2009; Haritash y Kaushik, 2009).

Sin embargo, para el buen desempeño de la biopelícula se requieren condiciones especiales de oxígeno, temperatura, pH, nutrientes (Betancourth *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2006), tipo de población microbiológica, grado de aclimatación, accesibilidad a nutrientes, estructuras químicas de los compuestos, propiedades del transporte celular y partición química en medio de crecimiento (Haritash y Kaushik, 2009). Muchos factores físicos y químicos, tales como condiciones hidrodinámicas, la señal intercelular y las interacciones metabólicas entre diferentes células y especies de bacterias, puede afectar el desarrollo de la biopelícula (Li y Pei, 2005). Los datos ecológicos básicos de los degradadores de HAPs en ecosistemas marinos es escaso. La información en su distribución, densidades, dinámica poblacional, genética de poblaciones e interacciones con otros microorganismos aguarda futuras investigaciones (Pothuluri y Cerniglia, 1994).

Los sitios contaminados con HAPs pueden ser remediados usando los microorganismos individualmente o combinados (Haritash y Kaushik, 2009; Varjani,

2017) siendo que los consorcios de comunidades microbiológicas han probado ser más potentes que los cultivos individuales, esto gracias a rutas metabólicas aeróbicas-anaeróbicas (Figura 10) (Varjani, 2017). De hecho, una variedad de géneros de bacterias, hongos y algas procedentes de suelo y agua marina, han sido aislados y caracterizados por su habilidad degradadora de HAPs (Haritash y Kaushik, 2009; Abdel y Mansour, 2016; Varjani, 2017). Por ello, cuando los suelos o las aguas se contaminan con hidrocarburos como el petróleo, las biopelículas cumplen un papel fundamental en su bioremediación (Singh *et al.*, 2006; Betancourth *et al.*, 2004). Sin embargo, la respuesta microbiana a un derrame petrolero en el mar, depende de numerosos factores, como la composición del aceite, el grado de meteorización, las condiciones ambientales, en particular la temperatura y las concentraciones de los nutrientes dispersos (McGenity *et al.*, 2012).

3.3.2. Rol de las bacterias como degradadores de HAPs

Muchas especies bacterianas capaces de biodegradar HAPs han sido aislados de agua marina y sedimentos (Pothuluri y Cerniglia, 1994) como se ha mencionado anteriormente. Numerosos hallazgos han verificado la superior adaptabilidad de las biopelículas bacterianas marinas en diversas condiciones de crecimiento, inclusive la aplicación de cepas marinas para el tratamiento de suelo terrestre contaminado con HAPs como el reportado por Mangwani y colaboradores (2017) en donde se ha caracterizado su potencial capacidad de biorremediación y el papel de varias enzimas que poseen las cepas bacterianas marinas (Ghosal *et al.*, 2016).

Históricamente hablando, *Alcanivorax borkumensis* SK2, es la primera bacteria marina hidrocarbonoclastica en ser secuenciada por Schneiker y colaboradores en 2006, y esta mundialmente presente en muchos ambientes marinos, desde mares árticos hasta océanos más cálidos como el océano pacífico. Dicha bacteria presenta capacidad degradadora de HAPs y es una bacteria dominante presente en los derrames de petróleo, donde se reporta que puede comprender entre el 80 al 90 % de la comunidad microbiológica degradadora de petróleo (Lorenzo, 2006; Atlas y Hazen, 2011). Otras son las bacterias oxidantes de los hidrocarburos las cuales son capaces de adherirse a las gotas insolubles de petróleo y lograr la dispersión de la capa. Estas

biopelículas están conformadas básicamente por especies de *Pseudomonas*, *Corinebacterias*, *Micobacterias* y algunas levaduras (Betancourth *et al.*, 2004).

Además, las bacterias se reportan como degradadores primarios y agentes más activos en la degradación de contaminantes de petróleo. Un número de especies de bacterias son conocidas por degradar HAPs. Por ejemplo, benzo(a)pireno puede ser degradado por los géneros *Pseudomonas* (especies *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *aeruginosa* y *fluoresens*), *Rhodococcus sp.*, *Haemophilus sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Paenibacillus sp.* (Haritash y Kaushik, 2009). Y especies de bacterias del género *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Marinobacter*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Ochrobactrum*, *Stenotrophomaonas*, *Vibrio* y *Klebsiella*, han demostrado ser capaces de biodegradar HAPs (Folwell *et al.*, 2016; Varjani, 2017).

Recientemente 184 organismos pertenecientes a especies bacterianas (halófilas-halotolerantes, arqueobacterias y cianobacterias) con capacidad degradadora de HAPs han sido enlistadas en el trabajo de Ghosal y colaboradores (2016), de los cuales, 81 de estos organismos han sido caracterizados como degradadores del fenantreno, acenafteno y fluoranteno (Tabla 4).

Tabla 4. Lista de organismos halófilos degradadores de HAPs (modificado de Ghosal *et al.*, 2016).

ID	Cepas bacterianas halófilas degradadoras de HAPs	Fenantreno	Acenafteno	Fluoranteno
1	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> (AxyI)	√		
2	<i>Acidovorax delafieldii</i> P4-1 (AdelS45P1)	√		
3	<i>Acinetobacter</i> sp. (Acin)	√		
4	<i>Acinetobacter</i> sp. AGAT-W (AcinAGATW)		√	
5	<i>Aeromonas</i> sp. S45P1 (AeroS45P1)	√		
6	<i>Agrobacterium</i> sp. (Agro)	√		
7	<i>Alcaligenes denitrificans</i> (Aden)		√	√
8	<i>Alcaligenes faecalis</i> AFK2 (AfaeAFK2)	√		
9	<i>Aquamicrobium defluvium</i> (Adef)	√		
10	<i>Arthrobacter</i> sp. P1-1 (ArthP11)	√		
11	<i>Arthrobacter sulphureus</i> RKJ4 (AsulRKJ4)	√		
12	<i>Bacillus cereus</i> P21 (BcerP21)	√		
13	<i>Burkholderia cepacia</i> 2A-12 (Bcep)	√		
14	<i>Burkholderia</i> sp. BS3702 (BurkBS3702)	√		
15	<i>Burkholderia</i> sp. C3 (BurkC3)	√		
16	<i>Burkholderia</i> sp. RP007 (BurkRP007)	√		
17	<i>Comamonas testosteroni</i> GZ38A (Ctes)	√		
18	<i>Comamonas testosteroni</i> GZ39 (Ctes)	√		
19	<i>Cycloclasticus</i> sp. A5 (CyclA5)	√		
20	<i>Cycloclasticus</i> sp. PS-1 (CyclPS1)	√		
21	<i>Cycloclasticus</i> sp. W (CyclW)	√		
22	<i>Haloarcula hispanica</i> (Hhis)	√		
23	<i>Haloarcula</i> sp. (Hala)	√		
24	<i>Haloarcula vallismortis</i> EH4 (HvalEH4)	√	√	
25	<i>Halobacterium piscisalsi</i> (Hpis)	√		
26	<i>Halobacterium salinarium</i> (Hsal)	√		
27	<i>Halobacterium</i> sp. (Halm)	√		
28	<i>Halococcus</i> sp. (Hals)	√		
29	<i>Haloferax</i> sp. (Halx)	√		
30	<i>Haloferax</i> sp. (Halx)	√		
31	<i>Haloferax</i> sp. (Halx)	√		
32	<i>Haloferax</i> sp. (Halx)	√		
33	<i>Halorubrum ezzemoulense</i> (Hezz)	√		
34	<i>Halorubrum</i> sp. (Halo)	√		

ID	Cepas bacterianas halófilas degradadoras de HAPs	Fenantreno	Acenafteno	Fluoranteno
35	<i>Janibacter</i> sp. YY-1 (JaniYY1)	√		
36	<i>Marinobacter falvimar</i> is (Mfal)	√		
37	<i>Marinobacter nanhaiticus</i> (Mnan)	√		
38	<i>Marinobacter sedimentalis</i> (Msed)	√		
39	<i>Methylobacterium</i> sp. (Meth)	√		
40	<i>Micrococcus</i> sp. (Micr)	√		
41	<i>Mycobacterium flavescens</i> (Mfla)	√		√
42	<i>Mycobacterium</i> sp. (Myco)	√		
43	<i>Mycobacterium</i> sp. BB1 (MycoBB1)	√		√
44	<i>Mycobacterium</i> sp. BG1 (Myco)	√		
45	<i>Mycobacterium</i> sp. CH1 (Myco)	√		√
46	<i>Mycobacterium</i> sp. CH-2 (MycoCH-2)	√		√
47	<i>Mycobacterium</i> sp. JS14 (MycoJS14)			√
48	<i>Mycobacterium</i> sp. KR20 (Myco)			√
49	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1 (MvanPYR1)	√		
50	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i> TSH1 (NotiTSH1)	√		
51	<i>Nocardioides</i> sp. KP7 (NocaKP7)	√		
52	<i>Ochrobactrum</i> sp. PWTJD (OchrPWTJD)	√		
53	<i>Paracoccus</i> sp. Ophe1 (ParaOphe1)	√		
54	<i>Pasteurella</i> sp. IFA (PastIFA)			√
55	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. P-1P41 (PseuP1P41)	√		
56	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Paer)	√		
57	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PF (Paer)	√		
58	<i>Pseudomonas mendocina</i> CGMCC 1.766 (PmenCGMCC1766)	√		
59	<i>Pseudomonas paucimobilis</i> (Ppau)	√		
60	<i>Pseudomonas putida</i> 9816 (Pput)	√		
61	<i>Pseudomonas putida</i> BS3701 (Pput)	√		
62	<i>Pseudomonas putida</i> OUS82 (Pput)	√		
63	<i>Pseudomonas</i> sp. (Pseu)	√		
64	<i>Pseudomonas</i> sp. DLC-P11 (Pseu)	√		
65	<i>Pseudomonas</i> sp. PP2 (Pseu)	√		
66	<i>Pusillimonas</i> sp. 21-11 (Pusi2111)	√		
67	<i>Rhodococcus</i> sp. (Rhod)			√
68	<i>Sinorhizobium</i> sp. C4 (SinoC4)	√		
69	<i>Sphingobium chlorophenolicum</i> (Schl)	√		
70	<i>Sphingobium</i> sp. PNB (SphiPNB)	√		

ID	Cepas bacterianas halófilas degradadoras de HAPs	Fenantreno	Acenafteno	Fluoranteno
71	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> B1 (SyanB1)	√		
72	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> var. EPA505 (Spau)	√		
73	<i>Sphingomonas</i> sp. A4 (Sphi)		√	
74	<i>Sphingomonas</i> sp. GY2B (SphiGY2B)	√		
75	<i>Sphingomonas</i> sp. LB126 (SphiLB126)	√		
76	<i>Sphingomonas</i> sp. P2 (SphiP2)	√		
77	<i>Sphingomonas</i> sp. ZL5 (SphiZL5)	√		
78	<i>Staphylococcus</i> sp. PN/Y (StapPN/Y)	√		
79	<i>Stappia</i> sp. 23-41 (Stap2341)	√		
80	<i>Vibrio cyclotrophicus</i> P-2P44 (VcycP2P44)	√		
81	<i>Agmenellum quadruplicatum</i> , strain PR-6 (Agme)	√		

3.3.3. Degradación de HAPs por biopelículas marinas

En el área de la biorremediación, las biopelículas son ampliamente reconocidos por su capacidad para mineralizar HAPs a productos solubles y hacerlos menos tóxicos (Haritash *et al.*, 2009; Passarini *et al.*, 2011, Gross *et al.*, 2012; Shukla *et al.*, 2014; Abdel *et al.*, 2016, Varjani, 2017). Este proceso envuelve la descomposición de compuestos orgánicos a través de la biotransformación dentro de metabolitos menos complejos como H₂O, CO₂ (aerobio) o CH₄ (anaerobio) (Figura 10) (Haritash y Kaushik, 2009; Atlas, 2011; Abdel y Mansour, 2016; Varjani, 2017).

El principal problema para el estudio de degradación de HAPs es la baja tasa de crecimiento de bacterias debido a la disponibilidad limitada de los sustratos de HAPs en la fase acuosa; su hidrofobicidad y tendencia a la adsorción a la materia orgánica dan como resultado una baja biodisponibilidad y una gran resistencia a la degradación (Folwell *et al.*, 2016; Mangwani *et al.*, 2017). Esto se debe a que la biodegradación se ve muy afectada por la biodisponibilidad, ya que su limitada solubilidad en agua hace que se adsorban con fuerza a las partículas orgánicas (Folwell *et al.*, 2016). Debido a la escasa solubilidad, el metabolismo de los HAPs a menudo está restringido por la transferencia de masa a la fase acuosa (Mangwani *et al.*, 2017).

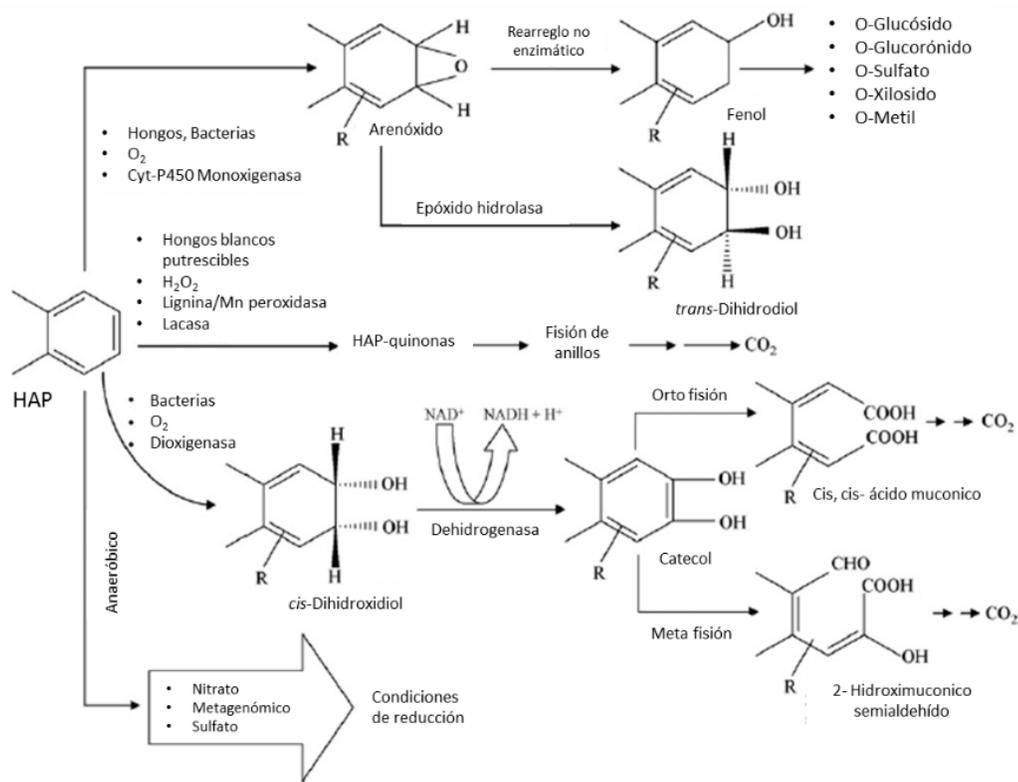


Figura 10. Ruta propuesta para el catabolismo microbiológico de HAPs (Modificado de Haritash y Kaushik, 2009).

Sin embargo, Mangwani et al. (2017) determinó que las sustancias polimericas extracelulares de la biopelícula marina es una fuente rica de biomoléculas activas, que pueden afectar significativamente la interacción de los HAPs con una célula aumentando la biodisponibilidad para las bacterias. Folwell et al. (2016) incrementaron la biodisponibilidad de HAPs de alto peso molecular (los mas difíciles de degradar) a través de microcosmos en medio liquido agitado con microorganismos degradadores de alto peso molecular de HAPs, reduciendo la interacción HAP-celulas y acelerando la biodegradacion. Dicho proceso aunque no ocurre naturalmente debido a que los HAPs son absorbidos fuertemente por la materia organica (y en sedimentos); si es suministrada una superficie adecuada de absorción y adhesiones es posible alcanzar aumentar la biodisponibilidad. Además, determinaron que la composición de la comunidad fúngica degradaba HAPs de mayor peso molecular con exoenzimas en fase planctónica unido a los filtros, en contraste con las bacterias que preferian crecer en filtros y degradar HAPs de menor peso molecular utilizando enzimas intracelulares.

4. MATERIALES Y METODOS

En la Figura 11 se observa el diagrama del procedimiento metodológico utilizado. El estudio se llevó a cabo en tres etapas, la primera fue la caracterización morfológica y elemental del soporte, la segunda el crecimiento de biopelículas y la realización de cinéticas de disipación del fenantreno, acenafteno y fluoranteno y por último durante la tercera etapa se caracterizaron morfológicamente las biopelículas y se determinó la diversidad y abundancia de los microorganismos presentes.

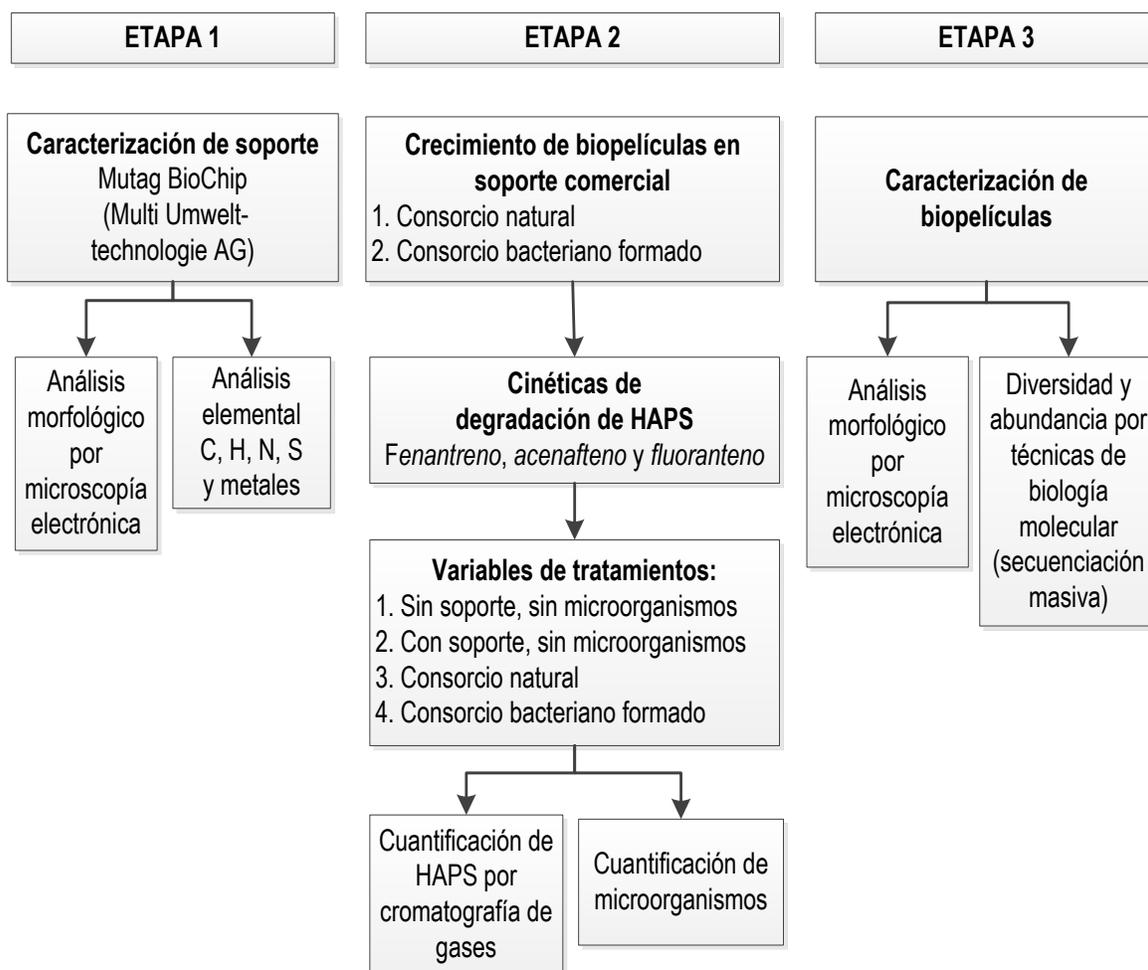


Figura 11. Diagrama metodológico del proyecto de tesis.

4.1. Materiales

4.1.1. Soporte para biopelículas Mutag BioChip™

El soporte utilizado para la formación de la biopelícula es el soporte Mutag BioChip™ de la empresa Multi Umwelttechnologie AG. Se caracteriza por ser un soporte de alta capacidad con una gran superficie porosa (Figura 12). Según la descripción de los fabricantes (Jürgen, 2014; Bernd, 2016, Multi Umwelttechnologie AG, 2018) presenta una superficie de más de $3000 \text{ m}^2/\text{m}^3$ lo que le confiere una amplia área superficial de crecimiento para los microorganismos. Mutag BioChip™ puede ser utilizado en condiciones de hábitat del tipo aerobio y anaerobio para el crecimiento de diferentes tipos de microorganismos. Se encuentra libre de bisfenol A y ftalatos (cancerígenos y tóxicos, respectivamente) y compuestos aromáticos. Mutag BioChip™ está fabricado a base de polietileno virgen (no PE reciclado), rellenos inorgánicos, pequeñas cantidades de ácido glicérico de monoéster (fabricado de aceite de coco), ácido cítrico y soda (Na_2CO_3).

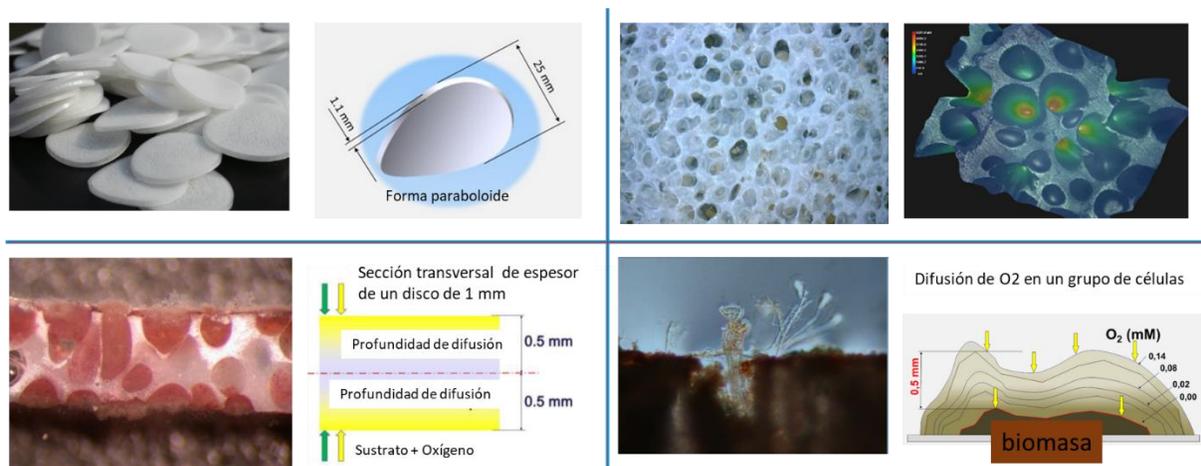


Figura 12. Características del soporte Mutag Biochip™ (modificado de Jürgen, 2014; Bernd, 2016; Multi Umwelttechnologie AG, 2018).

4.1.2. Hidrocarburos

Se utilizó una solución madre de fenantreno, acenafteno y fluoranteno en acetona grado HPLC a 20,000 ppm (aproximadamente 1 g de hidrocarburos según su pureza en 50 ml de acetona HPLC). Para la aclimatación de los consorcios, la concentración inicial y final fue de 100 ppm y de 200 ppm,

respectivamente. Para las cinéticas de degradación, la concentración inicial fue de 200 ppm.

4.1.3. Agua de mar

Se utilizó agua de mar recolectada en el muelle de pescadores de Puerto Progreso (Figura 15). Para el crecimiento de las biopelículas en presencia del pool de HAPs; se utilizó agua de mar filtrada sin esterilizar para el consorcio natural y para el consorcio formado, se utilizó agua de mar esterilizada en autoclave a 121 °C, 15 psi por 15 minutos. Para las cinéticas de degradación se utilizó agua de mar estéril en todos los tratamientos.

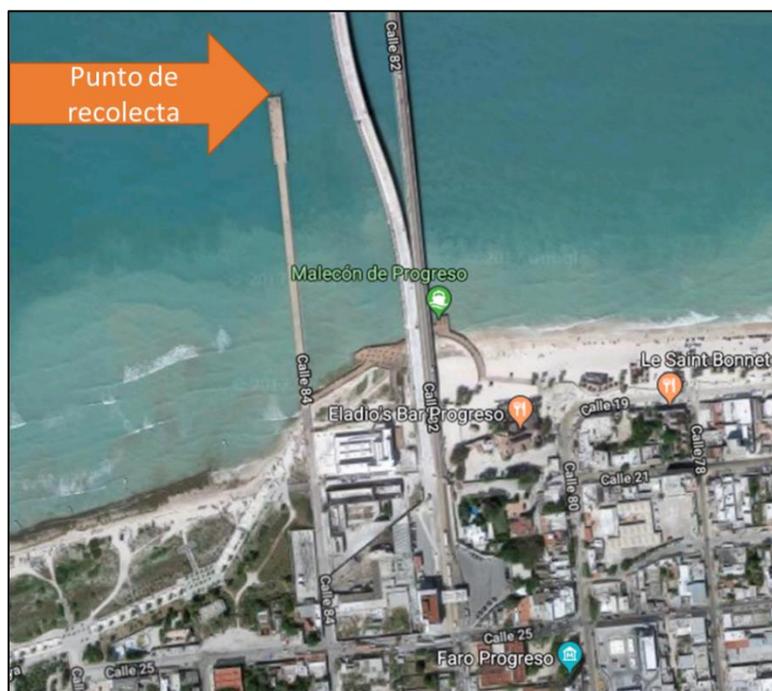


Figura 13. Punto de recolección de muestras de agua en Progreso.

4.1.4. Medios

Agua de mar sintética (AMS) (Lyman y Fleming, 1940): El consorcio bacteriano formado se aisló y se conservó en agua de mar sintética, hasta iniciar la aclimatación con HAPs a 100 ppm. El medio está constituido por litro de agua destilada con 24.5 g NaOH; 11.1 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 4.10 g Na_2SO_4 ; 1.54 g $CaCl_2$; 0.7 g KCl; 0.2 g $NaHCO_3$; 0.1 g KBr; 30 mg H_3BO_3 ; 20 mg $SrCl_2$ y 3 mg NaF. Para el medio sólido se agregó 15 g de agar noble. Después de aislar el

consorcio bacteriano formado se utilizó medio TSA para aclimatar los consorcios de acuerdo al proceso antes mencionado.

Agar de soya tripticaseína (TSA): Se utilizó agar TSA para los procesos de 1) aclimatación de los consorcios con hidrocarburos y 2) para el crecimiento de CFU en el proceso de cuantificación de colonias (apartado 5.2.4.3). Está constituido por los siguientes reactivos por litro, 15 g agar-agar; 5 g de NaCl; 15 g de peptona de caseína; 5 g de peptona de soya y pH 7.3 ± 0.2 .

4.2. Método

4.2.1. Caracterización del soporte

4.2.1.1. Análisis elemental.

El escaneo y el análisis multi-elemental cuantitativo del soporte Mutag BioChip™ fue realizado utilizando el analizador elemental orgánico FLASH 2000 Elemental Analyzer (Thermo Scientific™) acoplado a carrusel automuestreador MAS 200R (Thermo Scientific™) para sólidos, con un detector de conductividad térmica y un software Eager Xperience para Windows. El tratamiento de la muestra fue el siguiente: se pesaron tres muestras del soporte con 3 réplicas por muestra, los cuales fueron promediados, en un rango de 5-15 mg contenidas en capsulas de ignición (Universal soft tin containers) con las siguientes dimensiones: 5mm x 8mm, 157 mm. El escaneo de los diferentes elementos presentes en el soporte fue: carbón, nitrógeno, hidrogeno, azufre y oxígeno. Las concentraciones de las muestras fueron calculadas en porcentajes.

4.2.1.2. Microscopía electrónica de barrido.

Se realizó una caracterización morfológica del soporte sin y con crecimiento de biopelícula por microscopía electrónica a través de un microscopio electrónico de barrido de presión variable (VP-SEM), con módulo de transmisión STEM SU-3500 de marca Hitachi en la Universidad de La Frontera, en Temuco, Chile. El sistema óptico permite un gran campo de visión con aumentos de 5X a 300,000X. El tratamiento de la muestra fue el siguiente, se diseccionó el soporte a 1 X 1 cm y fue sujetado en un porta muestras de aluminio con cinta de doble faz de carbón. La energía de haz de

electrones fue de 5.00 kv, presión de 10 Pa, distancia de trabajo de 12.3 mm. Detector de difracción de rayos X (EDX) marca QUANTAX y detector BC+UVD para contrastes químicos y contrastes de topografía. Se tomaron aleatoriamente imágenes de las secciones.

4.2.2. Formación de biopelículas

Se crearon dos tipos de biopelículas de acuerdo a la “ETAPA 2” de la Figura 11: consorcio natural y consorcio bacteriano formado de cepas degradadores de HAPs previamente aisladas en el laboratorio de ingeniería ambiental de la FIUADY utilizando los HAPs acenafteno, fenantreno y fluoranteno como única fuente de carbono.

4.2.2.1. Consorcio natural o silvestre

Se obtuvieron muestras de agua de mar recolectadas en el muelle de pescadores de Progreso, zona con gran tráfico de embarcaciones y con continua contaminación con hidrocarburos. Se adaptaron a concentraciones iniciales y finales de 100 ppm y 200 ppm, respectivamente.

4.2.2.2. Consorcio bacteriano formado

Se conformó con cepas degradadoras de HAPs aisladas previamente en otros estudios realizados en el laboratorio de Ingeniería Ambiental. Estas cepas se adaptaron simultáneamente al consorcio natural a concentraciones iniciales y finales de 100 ppm y 200 ppm, respectivamente.

En el caso de ambos consorcios, en la Figura 14 se muestra el dispositivo montado para la formación, alimentación y adaptación de las biopelículas con los HAPs.



Figura 14. Representación esquemática del dispositivo para la aclimatación en HAPs de los consorcios natural y bacteriano formado.

El proceso de formación, alimentación y adaptación de las biopelículas con los tres HAPs a la concentración final de 200 ppm duró 6 meses (25 semanas), debido a que la cepa C3C perteneciente al consorcio bacteriano formado requirió más tiempo para su adaptación a 200 ppm. Para lograr la adaptación a 200 ppm de C3C, fueron sembradas colonias aclimatadas a 100 ppm, en placas con medio TSA a 200 ppm y aquellas colonias que toleraron 200 ppm, fueron resemebradas por sextuplicado en placas con medio TSA a 200 ppm hasta obtener placas con crecimiento abundante. Para todas las siembras y resiembras se utilizó el método de estriado continuo en línea recta. Durante este proceso semanalmente se alimentaban los reactores de aclimatación del consorcio natural (miércoles) y consorcio bacteriano formado (viernes).

Para la alimentación de los reactores de aclimatación del consorcio natural (6 reactores de 500 ml con 10 soportes c/u, total 60) se añadió el volumen evaporado con agua de mar natural con la misma concentración de HAPs de los reactores. Esto debido a la

evaporación-volatilización producida por la aireación y a la incubación a temperatura ambiente del laboratorio (se observó que en días calurosos el volumen de agua evaporada era mayor).

Para la alimentación de los reactores de aclimatación del consorcio bacteriano formado (3 reactores de 600 ml con 20 soportes c/u, total 60) se purgaron 200 ml o 150 ml del líquido (dependiendo del volumen evaporado para mantener un volumen residual de 400 ml de medio líquido y ajustarlo a un volumen final de 600 ml) de c/reactor y se añadieron 200 ml de agua de mar natural estéril a la misma concentración de HAPs de los reactores. Además, cada reactor fue inoculado con 2 ml con agua salina estéril al 0.85 % con bacterias mezcladas de las cepas A2A, D2A, C3C, L2F y L21 aclimatadas en HAPs en medio sólido TSA. Para llevar a cabo este paso, se rasparon dos cajas de cada cepa (10 en total) y se homogeneizaron las bacterias en 6 ml de agua salina estéril a 0.85 % (2 ml para c/reactor).

Una vez obtenidos todos los consorcios aclimatados a 200 ppm se realizó la cinética de degradación.

4.2.3. Cinética de la degradación de HAPs

Para evaluar la disipación de HAPs por los consorcios propuestos se llevaron a cabo cinéticas en las que se analizó el porcentaje residual del fenantreno, acenafteno y fluoranteno. Los cuatro diferentes tratamientos analizados fueron:

Tratamiento 1. Sin soporte, sin microorganismos (SM). Constituido de agua de mar filtrada y estéril, con solución madre (200 ppm de hidrocarburos), sin soporte Mutag Biochip™, sin microorganismos el cual sirvió como control experimental 1 para determinar el grado de evaporación de los HAPs.

Tratamiento 2. Con soporte, sin microorganismos (CM). Constituido de contenía agua de mar filtrada y estéril, con solución madre (200 ppm de hidrocarburos), con soporte Mutag Biochip™, sin microorganismos, el cual sirvió como control experimental 2, para determinar la influencia del soporte en el porcentaje de HAPs residual.

Tratamiento 3. Consorcio natural (CN). Constituido del consorcio natural (biopelículas formadas en el soporte) en agua de mar filtrada y estéril, con solución madre (200 ppm de hidrocarburos).

Tratamiento 4. Consorcio bacteriano formado (CB). Constituido del consorcio bacteriano de las cepas previamente aisladas (biopelículas formadas en el soporte), en agua de mar filtrada y estéril, con solución madre (200 ppm de hidrocarburos).

Los días de muestreo para la cinética fueron 0, 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 14 y 18 (10 días de muestreo en total). Las cinéticas se llevaron a cabo mediante reactores continuo tipo batch. Las características de este procedimiento se muestran en la Figura 15:



Condiciones para la cinética de degradación

- 9 soportes Mutag Biochip por reactor
- Agua de mar filtrada estéril 800 ml por reactor
- Concentración final de HAPs a 200 ppm
- 150 rpm de agitación
- Incubación a temperatura ambiente
- Muestreo de 4 replicas para el tratamiento C. bacteriano formado y C. natural
- Muestreo de 1 replica para Ctrl 1 y Ctrl 2
- Días de muestreo: 0, 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 14 y 18 (10 días)

Tratamientos

1. C1: Sin soporte, sin microorganismos
2. C2: Con soporte, sin microorganismos
3. CN: Consorcio natural
4. CB: Consorcio bacteriano formado

Figura 15. Representación esquemática del dispositivo experimental para la realización de las cinéticas de degradación de HAPs.

4.2.4. Método para la cuantificación de HAPs

4.2.4.1. Extracción líquido-líquido

Para este proceso, una mezcla 1:1 de hexano HPLC - Diclorometano fue el compuesto principal de los HAPs para la disolución. Se utilizaron 15 ml de muestra; se extrajeron 5 ml, 3 veces para los lavados (15 ml de hexano HPLC total). La fase orgánica fue colectada en los 15 ml de hexano HPLC y se concentraron los HAPs dejando evaporar toda la noche. La muestra fue reconstituida con 1 ml de hexano HPLC en viales de

vidrio y estos fueron almacenados para su futuro análisis cromatográfico. El lavado del material fue el siguiente: sonicar con Extran al 30% por 20 min, enjuague con agua de la llave, sonicar con agua destilada por 10 min, sonicar con hexano 20 por min, sonicar con metanol por 10 min y enjuagar con acetona técnica.

4.2.4.2. Método cromatográfico

Los residuos de fenantreno, acenafteno y fluoranteno fueron cuantificados usando un cromatógrafo 1300 Trace GC (Thermo Scientific®) Ultra acoplado a un detector de ionización de flama (FID). Se utilizó una columna capilar Thermo TR-5MS de 30 metros de longitud por 25 milímetros de diámetro y 0.25 micrómetros de tamaño de poro. Para el análisis, el inyector que se implementó fue un Split/Splitless a 250 °C. La temperatura del horno fue de 60 °C (1 min) a 300 °C (2 min) con una rampa de temperatura de 10 °C por minuto. El detector tuvo una temperatura de 300 °C y se usó nitrógeno como *make up*. Los límites de cuantificación (LC) y detección (LD) fueron de entre 0.03 y 0.02 mg/L, respectivamente.

4.2.5. Cuantificación de microorganismos

Simultáneamente se realizó la cinética microbiana de los tratamientos 3 y 4 (Figura 15). Para cuantificar la población microbiana, se realizó por conteo en placas con diluciones 0, -1, -2, -3, -4 y -5, (1 ml de alícuota, diluido en 9 ml de una solución salina al 0.89%, de esa dilución se tomó 1 ml y se diluyó en 9 ml, de agua salina, hasta alcanzar las diluciones establecidas). De cada disolución se tomó una alícuota de 100 µL, la cual fue sembrada en agar TSA e incubada tres días a temperatura ambiente. Dichos conteos se realizaron al inicio y al final de cada cinética (día 0 y día 18), se determinó el número más probable.

4.2.6. Caracterización de las biopelículas

Fueron enviados para su caracterización con el Microscopio electrónico de barrido de presión variable (VP-SEM) de la Universidad de la Frontera (Chile) 1 soporte de los tratamientos 3 y 4. Los soportes utilizados para este análisis fueron los del muestreo del día 0.

4.2.6.1. Extracción de ADN metagenómico.

Para la extracción de ADN se utilizó el “Protocolo para la extracción de ADN de sedimentos” método de lisis *in situ* y adsorción en sílice de acuerdo a Rojas *et al.* (2008). Este procedimiento consistió en dos fases: A. Fase de lavados de sedimentos, B. Extracción y purificación del ADN con los Buffers TE y TEN. Al finalizar el proceso de extracción se verificó la integridad de la banda de ADN metagenómico realizando una electroforesis en un gel de agarosa al 1 % y se cuantificó por espectroscopia UV a 260 y 280 nm con la finalidad de medir la cantidad y calidad de ácidos nucleicos (esto permite determinar impurezas presentes durante el proceso de extracción, según sea el caso se realizará un proceso de purificación).

4.2.6.2. Secuenciación masiva de microorganismos

Las muestras optimas de ácidos nucleicos (de acuerdo a la relación de absorbancia A260/A280), se enviaron al Laboratorio Research and Testing Genomics en Lubbock Texas EE. UU. para la amplificación y secuenciación de la región V1 del gen 16S ARN ribosomal que permite la amplificación del gen de bacterias utilizando los primers 28F y 519R. La secuenciación de la biblioteca de productos amplificados se realizará través del secuenciador Illumina Mi Seq con una resolución de lectura de 300 ciclos (extremos pareados) con una duración aproximada de 56 horas.

Se analizaron las secuencias con la ayuda de programas públicos para identificar las unidades taxonómicas operativas (OTUs), construir el árbol de detección microbiana y se determinara los índices de diversidad alpha y beta de las biopelículas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. Caracterización del soporte

5.1.1. Análisis elemental del soporte

De acuerdo con el Servicio Técnico de Investigación de la Universidad de Alicante el análisis elemental es una técnica que proporciona el contenido total de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre presente en un amplio rango de muestras de naturaleza orgánica e inorgánica tanto sólidas como líquidas. La técnica está basada en la completa oxidación de la muestra mediante una combustión con oxígeno puro a una temperatura aproximada de 1000 °C. Los diferentes productos de combustión CO₂, H₂O y N₂, son transportados mediante un gas portador (también llamado gas maquillante “*make up*”) a través de un tubo en el cual los elementos son selectivamente separados en columnas específicas para ser luego liberados térmicamente. Finalmente, los gases pasan de forma separada por un detector de conductividad térmica que proporciona una señal proporcional a la concentración de cada uno de los componentes individuales de la mezcla (Sstti.ua.es., 2017).

A continuación, se muestra el promedio obtenido del análisis elemental de tres soportes Mutag Biochip™.

Tabla 5. Porcentajes obtenidos del análisis elemental por cromatografía del soporte de biopelículas Mutag Biochip™.

Elemento	Cantidad
Peso (mg)	2
% Nitrógeno	9.35
% Carbón	40.34
% Hidrogeno	7.48
% Azufre	21.48

Existen pocas publicaciones en el área de ingeniería ambiental que aplique un análisis elemental a estos soportes. Es importante determinar sus componentes elementales, porque ha sido reportado que otros soportes convencionales como arcilla, vidrio, espuma mineral, escoria, etc. Han producido mayor biomasa en el tratamiento de aguas residuales con fármacos, pero también se ha demostrado que estos soportes

remueven más eficientemente ciertos fármacos (Zupanc *et al.*, 2013). Posiblemente, sus componentes podrían influir en su interacción con el agente a tratar. En general, el peso promedio de los soportes es de 2 mg, con porcentaje de carbón, azufre, nitrógeno e hidrogeno de 40.34, 21.48, 9.35 y 7.48, respectivamente.

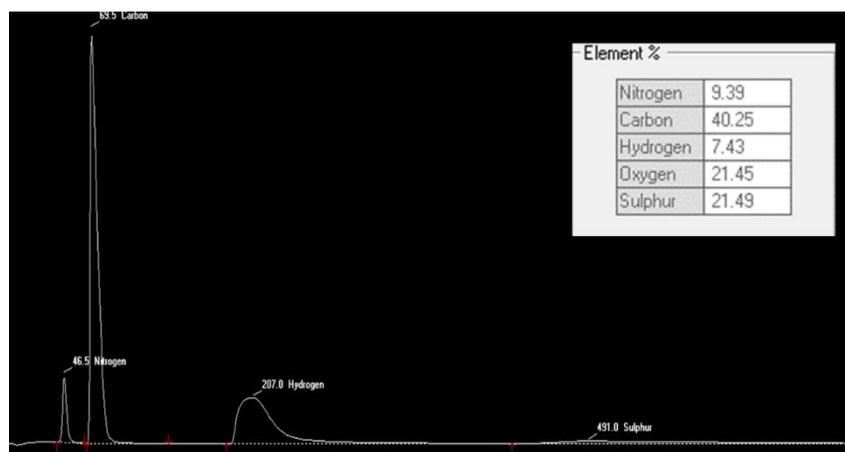


Figura 16. Gráfica del análisis elemental (C, H, N, S) del soporte Mutag Biochip™.

De acuerdo con la gráfica de la Figura 16 del análisis cromatográfico fueron detectados cinco elementos incluido el oxígeno y el porcentaje elemental del oxígeno es de 21.45 %. El carbón mostro un contenido alto de iones y un tiempo de retención de 63.5 min.

5.1.2. Análisis morfológico del soporte Mutag Biochip™

La caracterización morfológica del soporte es importante para determinar los espacios superficiales activos que ocuparan las biopelículas. Para ello, es necesario comparar las imágenes *a priori* y *a posteriori* del crecimiento de las biopelículas, como punto de referencia para determinar cómo los espacios del soporte fueron ocupados. Las características morfológicas que presentan el soporte son: diámetro promedio de 22 mm, grosor promedio de 1 mm y forma redonda con una parte cóncava lo que le confiere una forma paraboloides.

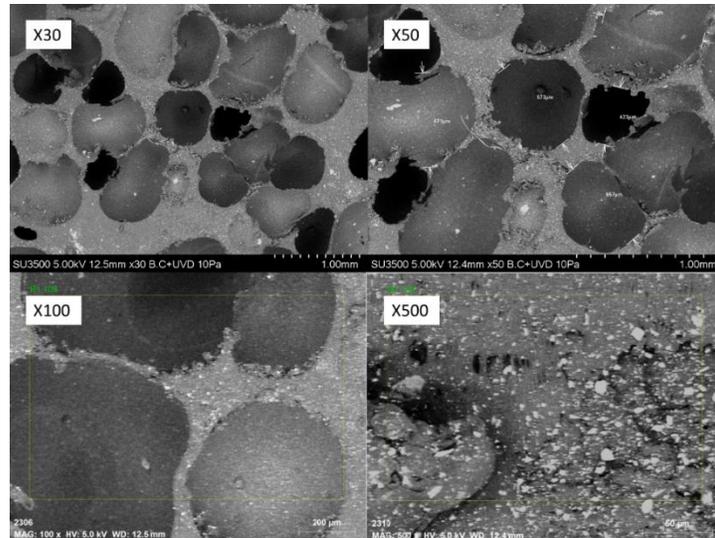


Figura 17. Resultados obtenidos de la microscopía electrónica de barrido con diferentes escalas de zoom.

En la Figura 17 se muestran las imágenes obtenidas del Microscopio electrónico de barrido de presión variable (VP-SEM) Hitachi, con diferentes escalas de zoom desde X30 hasta X500. La escala X50 es el zoom de la región X30 y la región X500 es el zoom de la región X100. La imagen con zoom X50 muestra los diferentes diámetros de los pozos del soporte.

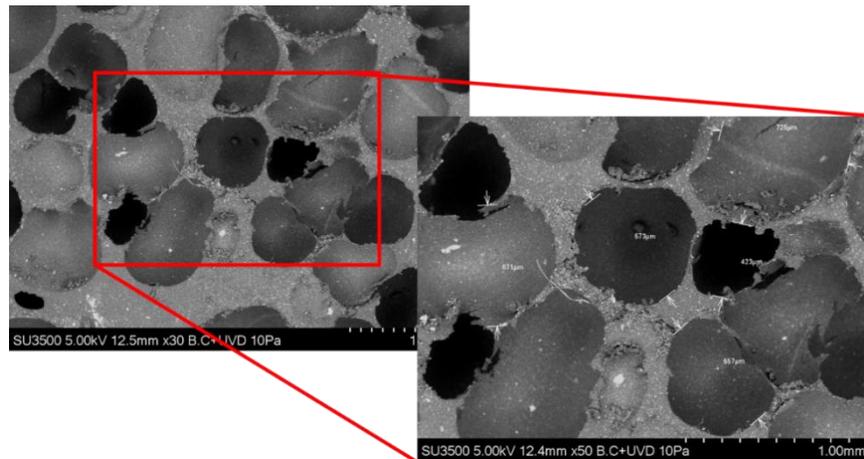


Figura 18. Zoom de una región del soporte de X30 a X50 mostrando los diámetros de los poros.

En la Figura 18 se muestran los poros y la superficie del soporte, donde los microorganismos pueden crecer. Los diámetros en micrómetros de los poros detectados por el equipo se muestran en el zoom X50.

5.2. Formación de biopelículas en HAPs

5.2.1. Consorcio natural

A continuación, se presenta el crecimiento de las biopelículas tomadas en estereoscopio a 40X donde se muestra el crecimiento del consorcio natural en agua de mar filtrada sin esterilizar.

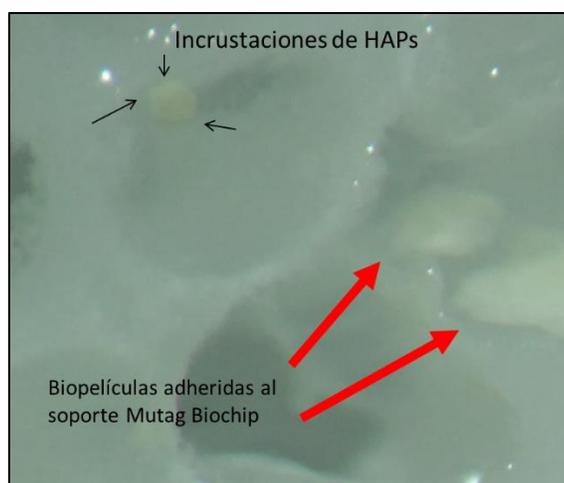


Figura 19. Biopelículas del consorcio natural formado en presencia de la mezcla de HAPs a 200 ppm.

5.2.2. Consorcio bacteriano formado

A continuación, se muestran las 5 cepas bacterianas formadas en el laboratorio de ingeniería ambiental de la FIUADY: A2A, D2A, C3C, L2F y L21 las cuales fueron aclimatadas a 200 ppm del pool de HAPs en medio TSA sólido y se muestran las biopelículas formadas en el soporte con las cepas anteriormente mencionadas, las cuales fueron alimentadas con 200 ppm de la mezcla de HAPs como única fuente de carbono en agua de mar filtrada estéril.

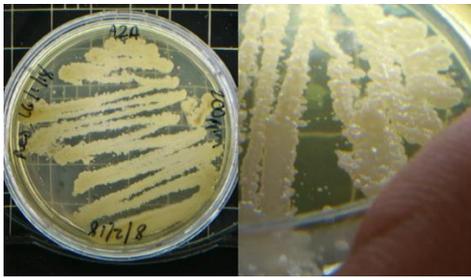


Figura 20. Cepa A2A formada en 200 ppm.



Figura 21. Cepa C3C formada en 200 ppm.

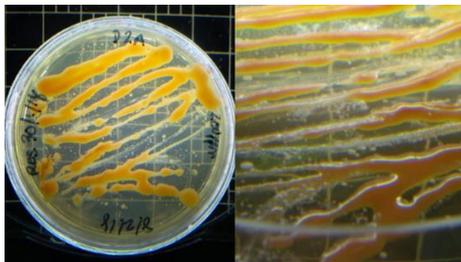


Figura 22. Cepa D2A formada en 200 ppm.

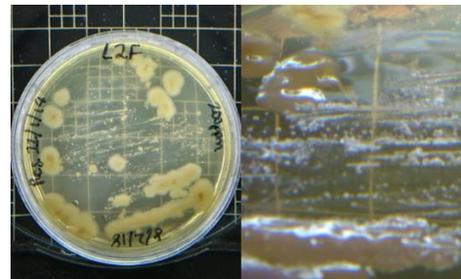


Figura 23. Cepa L2F formada en 200 ppm.

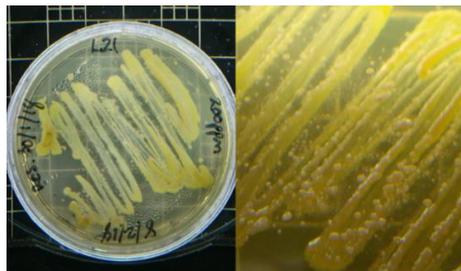


Figura 24. Cepa L21 formada en 200 ppm.

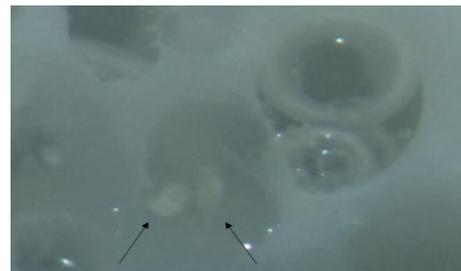


Figura 25. Biopelículas del consorcio bacteriano formado de las 5 cepas en presencia de los HAPs a 200 ppm.

5.3. Caracterización de biopelículas

5.3.1. Identificación de las cepas del consorcio bacteriano formado por biología molecular

Posteriormente de concentrar las cepas (A2A, D2A, C3C, L2F y L21) desde placas con medio TSA en buffer TEN, se realizó el método de extracción de ADN de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 4.2.6.1. Dichos productos puros fueron enviados

para su secuenciación en MACROGEN en Corea del Sur. Las secuencias completas de cada cepa se presentan a continuación:

Secuencia de la cepa A2A:

5'→TGAATGCGCCTGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGGCGACGGGTGAG
TAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCAT
GGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTC
ACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTCCGGATCG
TAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAGAGTAAGTCTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTA
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGT
TTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGA
GTGGAATCCACGTGAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGT
GACGCTGAGGAGCGAAAGCCTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGT
GTTAGGGGGTTTCGCCCTTAGTGTGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACT
CAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCCAAGAACCTTACCAGTCTT
GACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGTCATGGTTGTCGTCAGCTCGT
GTCCTGAGATGTTGGGGTAAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTGATCTTATTTGCCACCATTCAATTTGGGGC→3'

Secuencia de la cepa C3C:

5'→GGGGGGGGGCCCGCTAAAAATGCAGTCGCCGGTGAAGCAGGAGCTTGCTCTTGTGGATCAGTGGCGAACGGGTGAGT
AACACGTGAGCAACCTGCCCGGACTCTGGGATAAGCGCTGGAAACGGCGTCTAATACTGGATACGAGTAGCCACCGCAT
GGTCAGCTATTGGAAAGAATTCGGTCTGGGATGGGCTCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGC
GTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTC
TTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTACGGTACCTGCAGAAAAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATAC
GTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGTCTGCTGTGAAATCTGGGG
GCTCAACCCCCAGCCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCGGTAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAA
TGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGGCCGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGGG
GAGCAAAACAGGCTTAGATACCTGGTAGTCCACCCCGTAAACGTTGGGAAGTGTGGGGTCCATTCCACGGATTCCCGT
GACGCACTAACGCATTAAGTTCGCCCTGGGGAGTACGGCCGGAAGGCTAAAAGTCAAAGGAAATTGACGGGGACCCCGC
ACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGACATATACGAAGAACGGGCCAG
AAATGGTCAACTCTTTGGACTCGTAAACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGGTAAAGTC
CCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCTATGTTGCCAGCCACGTAATGGTTGGGAAGTCAATGGGGATACTGGCCGGGGTCAA
CTCCGGAAGGAAGGGTGGGGGATGAACGTCAAATCATCCAGGCCCCCTAAG→3'

Secuencia de la cepa D2A:

5'→GGGGCGGCCCTCCTCAGGCTGGATCCCTCCTTTAGGTTGATTGCCTCTTGTGAGGTTGGATGCCTCCTTTAAGGGG
GGATTCTCCTTTACGTGCGGATAACCTGGGAAATGGGTCTAATACCGGATATGAGCTCTGGCCGCATGGTCTGGGGTTG
GAAAGTTTTTCGGTGCAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGACGGGTA
GCCGGCCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGGGATGACGGTCTTTTCGGATTGTAACCCCTTTAGTAG
GGACGAAGCGCAAGTACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTG
CGAGCGTTGTCGGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTACGTCGCTGTGAAATCCTCCAGCTTAACTG
GGGGCGTGCAGGCGATACGGCAGACTTGAGTACTACAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAT
ATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGTAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCATGGGGTAGCGAA
ACAGGATTAGATACCCTGGGTAGTCCATGCCGTAACCGGTGGGCGCTAGGTGTGGGGGTCCTTCCACGGGATCCGTGC
CGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCCTGGGGAATACGGCCGCAAGGCCTAAAAGTCAAAGGGAAATTGACGGGGGGCC
CGCAAGCGGCGAGCATGTTGGAATTAATTTTCGATGCAAGCGAAGAACTTACTTAGGGTTTGGACATATACCGG
GACCAACGGCGAGAAAATGTCCTGTTTCCCTTGTGGGCTTGAATACCAAGGGTGGGTGGCATGGGTTTGTCCGTCAGCC
TCCGTGTTCCGTGAAAAATGTTGGGGTTTAAAGTCCCCGCCAAACGAAGCCGGCAAAACCCCTTGGTCTTCAATGTTGCC
CCAGCCACCGTTAATGGTTGGGGGAACTTCTTGGAAAAAAACCTT→3'

Secuencia de la cepa L2F:

5'→GGGGACATGGCGCAGCTACACATGCAGTCGAGCGGTAACAGATGGTAGCTTGCTACACGCTGACGAGCGGGCGGACGG
 GTGAGTAATGCATAGGAATCTGCCGATAGTGGGGGATAACCTGGGGAAACCCAGGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGA
 GAAAGGGGGCTTCGGCTCCCGCTATTGGATGAGCCTATGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTTACCAAGGCAAC
 GATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGACTGAGACACGGCCCCGAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
 GGAATATTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTCGGGTTGTAAAGCACTTCA
 GCGAGGAAGAACGCCTATCGGTTAATACCCGGTAGGAAAGACATCACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAG
 CAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGCTTGATAAGCCGG
 TTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACGGCATCCGGAAGTGCAGGCTAGAGTGCAGGAGAGGAAGGTAGAATTCCC
 GGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCCGCCTTCTGGACTGACACTGACACTGAGG
 TGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGCGACCAGCCGTTGGGTGCCT
 AGAGCACTTTGTGGCGAAGTTAACCGGATAAGTGCACCGCTGGGGGAGTACGGCCCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAAA
 TTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAAGCATGTGGGTTAAATTCGATGGCAACGCCGGAGAAACCTTTACCTACCCC
 TTGAACATCTAACAGAAAAGCCCGAAGAAGAATTCTGGGTGGTGCCCTTTCGGGAAACTGTTAAGAACAGGGGTGCCCTGCCA
 TGGGCTGTTTCAGCCTCCGTGTTGGTGAAAATGGTTGGGGTTAAGTTCGCCGTAAACGAAGCGCCAACCCCTTGGTC
 CTTTATTTTGCCAGCCGAAGTAAATGGTCCGGGGAAACTCCTAAAGGAAAACTGGCCCCGGGG→3'

Los resultados de la identificación por medio del programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), indicaron una coincidencia en el porcentaje de la secuencia de nucleótidos con cuatro géneros diferentes, *Bacillus pumilus*, *Microbacterium keratanolyticum*, *Dietzia aurantiaca* y *Halomonas sp.*, con un porcentaje de similitud de identidad entre ≥ 94 -99 %.

Tabla 6. Resultados de la secuenciación genómica.

Código	Especie bacteriana	Identidad (%)
A2A	<i>Bacillus pumilus</i> strain 1.19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
C3C	<i>Microbacterium keratanolyticum</i> strain MCDA05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98
D2A	<i>Dietzia aurantiaca</i> strain SFC20131227-PB016 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94
L2F	<i>Halomonas sp.</i> N39 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95

Se acepta que una similitud ≥ 98.5 % define una especie y tasas ≥ 95 -99 % definen un género, sin embargo, este criterio depende del género y especie en estudio. De lo anterior se deduce que las cepas L2F, C3C y A2A, pertenecen a *Halomonas sp.*, *Microbacterium keratanolyticum* y *Bacillus pumilus*, respectivamente. Mientras que la cepa D2A pudieran tratarse de una nueva especie. Todas las especies identificadas se encuentran en la base de datos de bacterias con capacidad degradadora de HAPs

del Enciclopedia de Kyoto de Genes y Genomas (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Pathway Database).

5.3.2. Identificación por secuenciación

La identificación de bacterias por secuenciación se muestra en la Tabla 7 en donde se muestra la diversidad y abundancia de las especies presentes. El criterio de selección fueron aquellas especies que presentaron un porcentaje de abundancia $\geq 1\%$.

Tabla 7. Identificación metagenómica del consorcio natural aclimatado en acenafteno, fenantreno y fluoranteno.

DOMINIO	PHYLUM	CLASE	ORDEN	FAMILIA	GENERO ESPECIE	%abundancia
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Roseovarius sp.</i>	29
					<i>Ruegeria sp.</i>	2
					<i>Salipiger sp.</i>	5
	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Idiomarinaceae	<i>Marinobacter sp.</i>	1
					<i>Idiomarina sp.</i>	2
		Oceanospirillales	Alcanivoracaceae	Halomonadaceae	<i>Alcanivorax sp.</i>	6
					<i>Halomonas sp.</i>	31
	Sin clasificar					15
	Sin clasificar					5

Todas las especies identificadas se encuentran en la base de datos de bacterias con capacidad degradadora de HAPs de la Enciclopedia de Kyoto de Genes y Genomas (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Pathway Database) (KEEG, 2018).

5.3.3. Análisis morfológico por microscopía electrónica de los consorcios

En la Figura 26 y 27 se muestran los resultados de la caracterización microscópica de los dos consorcios utilizados para la cinética.

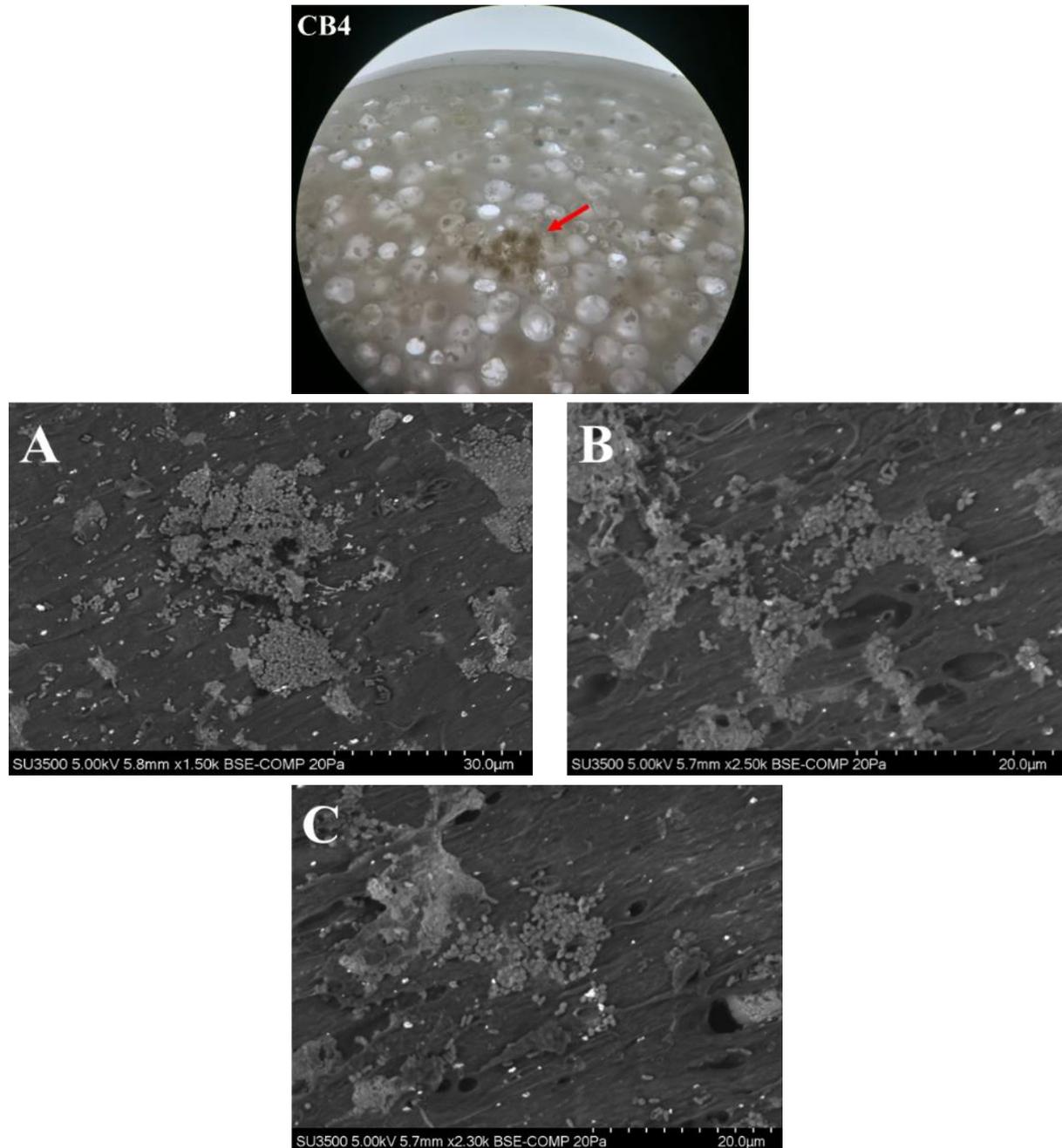


Figura 26. Estereoscopia y micrografías al microscopio electrónico de barrido de los consorcios CB4: Consorcio formado, A (30 μm), B (20 μm) y C (20 μm).

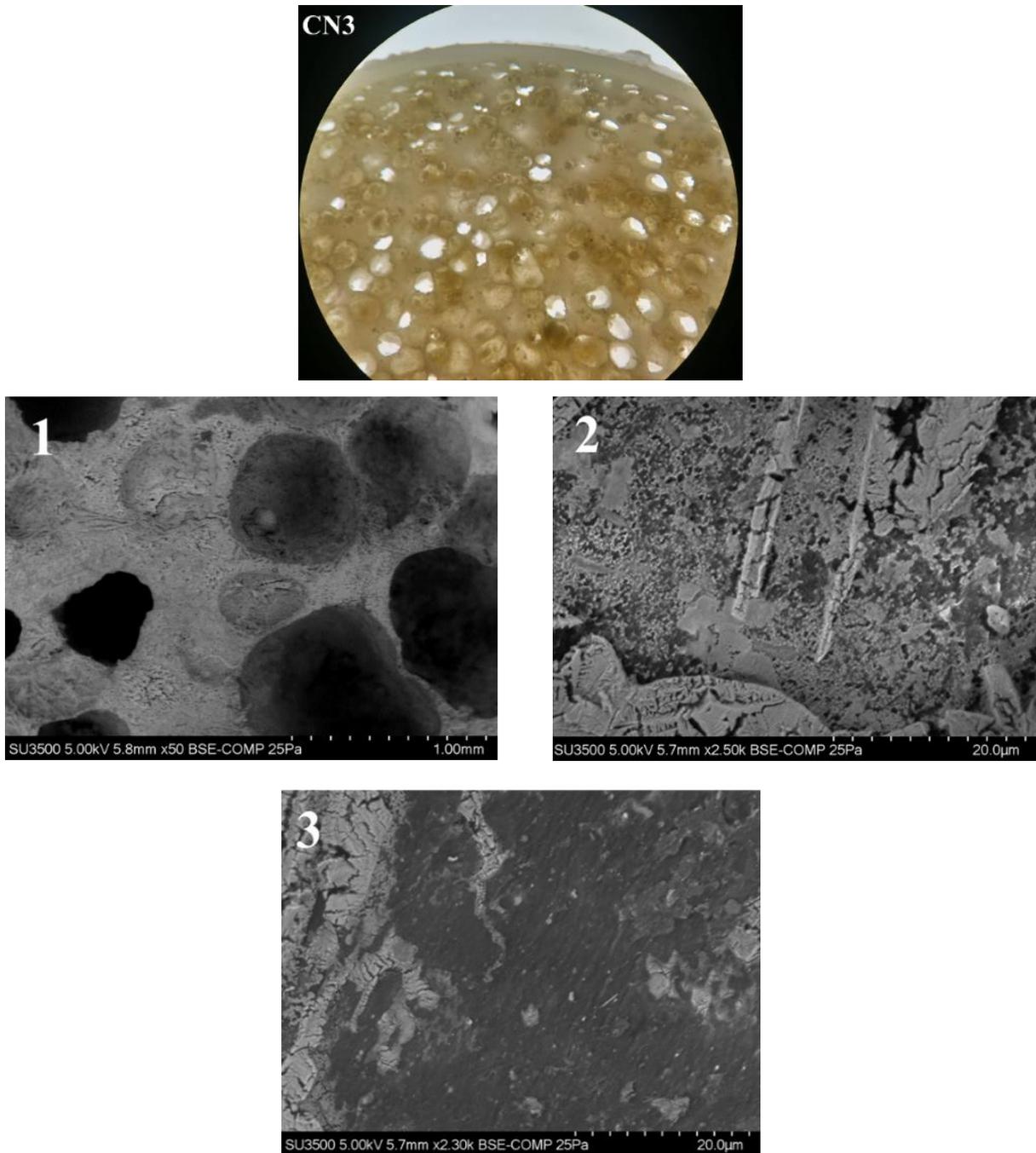


Figura 27. Estereoscopia y micrografías al microscopio electrónico de barrido de los consorcios CN3 consorcio Natural, 1 (1 mm), 2 (20 µm) y 3(20 µm).

En la Figura 26 el consorcio bacteriano formado (CB4, A, B y C): CB4 es una fotografía en el estereoscopio aumentada a 10X de un soporte del reactor CB4; A (x1.50k), B (x2.50k) y C (x2.30k) son micrografías con diferentes aumentos del consorcio bacteriano formado. En la Figura 27 el consorcio natural (CN3, 1, 2 y 3): CN3 es una

fotografía en el estereoscopio aumentada a 10X de un soporte del reactor CN3; 1 (X50), 2 (x2.50k) y 3 (x2.30k) son micrografías con diferentes aumentos del consorcio natural.

Se observa en los paneles CB4, A, B y C el crecimiento del consorcio bacteriano formado. En el panel CB4 la flecha roja indica la formación de una biopelícula en mezcla con cristales de HAPs. En los paneles A, B y C se observa la formación de biopelículas los cuales se encuentran adheridos en la superficie activa del soporte Mutag BioChip, en estas imágenes se observa la formación de células bacterianas en forma de cocos. Los paneles CN3, 1, 2, y 3 se presentan fotografías correspondientes a la formación del consorcio natural. En la región izquierda del panel 3 se observa los cristales de HAPs impregnados en el soporte y en la región derecha zonas menos impregnadas (zona oscura), mientras que en el panel 1 se observa el cubrimiento de cristales de HAPs en casi la totalidad de la superficie activa del soporte.

5.4. Cinética de degradación

Se realizó una cinética de degradación de tres HAPs: acenafteno, fenantreno y fluoranteno en agua de mar estéril durante 10 días de muestreo (días 0, 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 14 y 18) utilizando los cuatro tratamientos descritos en la Figura 11 y en la sección 4.2.2. Para cada tratamiento la concentración inicial de los HAPs en los reactores fue de 200 ppm en un volumen final de 800 ml, equivalente a 160 000 µg de peso.

Los resultados del crecimiento de UFC no se presentó debido a que el conteo de colonias en cada una de las cuatro réplicas de los tratamientos de CN y CB produjeron cultivos de crecimiento menores a 30 colonias y mayores a 300 colonias, lo cual está fuera del rango aceptado en la NOM-092-SSA-1994 y en *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Se obtuvieron cultivos menores a 30 en el tratamiento de CN y mayores a 300 en el tratamiento de CB, esto puede deberse a que CB era un tratamiento con una mayor carga bacteriana, ya que previamente se raspaban de colonias formadas de los cultivos puros en medio TSA-agar aclimatados en los tres HAPs a 200 ppm.

A continuación, se presentan las gráficas de dispersión de los muestreos de acenafteno, fenantreno, fluoranteno durante la cinética.

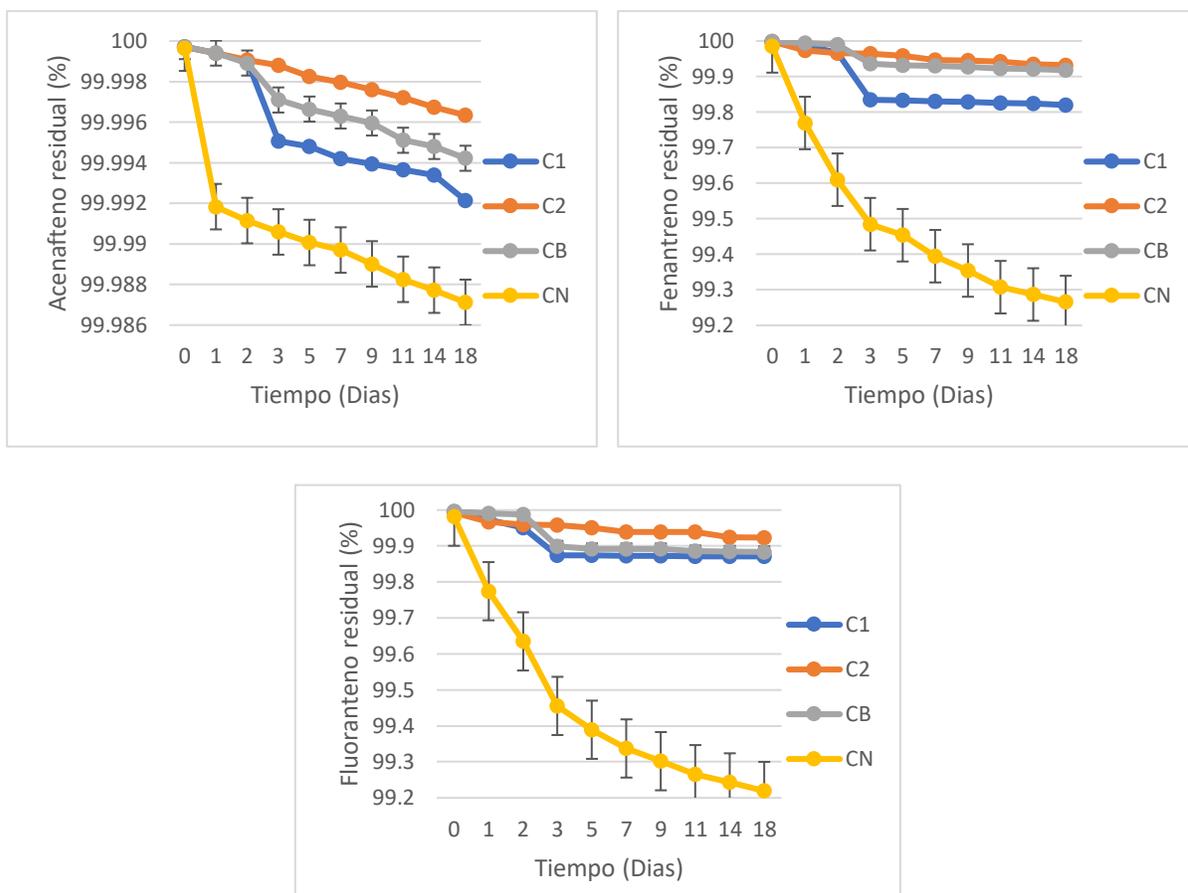
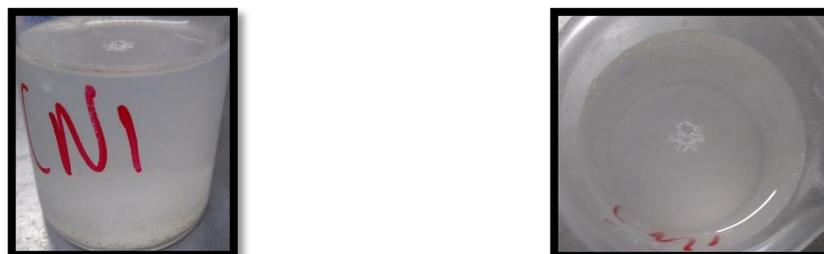


Figura 28. Porcentaje residual de Acenafteno, Fenantreno y Fluoranteno durante la cinética de degradación.

Con base en los resultados obtenidos en porcentajes residuales de cada hidrocarburo por tratamiento (Figura 28) se observó un porcentaje de degradación máximo alcanzado el día 18 de 0.2 % para acenafteno y fenantreno y 0.014 % para fluoranteno (200 ppm = 100 % de la concentración total en cada reactor). De acuerdo a la toma de las muestras (15 ml de cada reactor por día de muestreo) las concentraciones obtenidas fueron bajas debido a la poca homogeneidad de la muestra. Los HAPs no fueron obtenidos en el volumen muestreado porque se encontraron adheridos o precipitados dentro del reactor. Una fracción explicaría la presencia grandes concentraciones de los HAPs en forma de cristales precipitados en el fondo del reactor

y cristales en la superficie líquida por la tensión superficial, además de encontrarse adheridos en los soportes (Figura 29).



a. Cristales de HAPs precipitados b. Cristales de HAPs en la superficie

Figura 29. Cristales precipitados (a) y suspendidos en la superficie (b) de los tres HAPs, demostrando que la toma de muestra no fue representativa. Después de confirmar concentraciones bajas de HAPs en la cinética de degradación se determinó la dispersión de los HAPs por balance de masas.

5.4.1. Concentración de HAPs por peso

De acuerdo al párrafo anterior se procedió a determinar por balance de masas la concentración de los HAPs. Se determinó la concentración de los HAPs en la fase líquida al final de la cinética (igual al promedio de los pesos de los HAPs obtenidos durante los diez días de muestreos para cada tratamiento), promedio de la concentración en la fase sólida del soporte o impregnada para cada tratamiento y la volatilización por diferencia de pesos de acuerdo a la concentración obtenida en el tratamiento C1 (sin soporte, sin microorganismos).

Tabla 8. Tabla de los pesos del acenafteno identificados en la cinética de degradación.

Acenafteno	{ Inicial	{ Líquido	{ Soporte	{ Total de los muestreos	{ Volatilización
C1	160 000 µg (100 %)	86 694 µg (54 %)	0 µg (0 %)	12 µg (<0.1 %)	73 294 µg (46 %)
C2	160 000 µg (100 %)	18 969 µg (12 %)	20 365 µg (13 %)	6 µg (<0.1 %)	73 294 µg (46 %)
CB	160 000 µg (100 %)	82 803 µg (52 %) <u>±8479</u>	16 799 µg (10 %) <u>±773</u>	9 µg (<0.1 %) <u>±4.67</u>	73 294 µg (46 %)
CN	160 000 µg (100 %)	67 209 µg (42 %) <u>±21397</u>	19 915 µg (12 %) <u>±751</u>	21 µg (<0.1 %) <u>±4.99</u>	73 294 µg (46 %)

En la Tabla 8 se muestra los resultados de la dispersión del acenafteno en donde la volatilización representó aproximadamente el 46 % de la dispersión de los HAPs. Entre el 42 y 54 % de los HAPs se quedaron en la fracción líquida del reactor, pero en el tratamiento C2 se logró cuantificar hasta el 12 % del total de los HAPs. Realizando un balance de masas se demuestra que para este tratamiento existe una falta de HAPs debido a que, durante la filtración líquida el reactor fue el último en ser alimentado con la mezcla de agua de mar con HAPs y a pesar de homogenizarlo la mayoría de las sales obstruyeron los poros de la columna por lo que fueron necesario filtrar en tres membranas. Cabe mencionar que sucedió lo mismo para los siguientes hidrocarburos como se muestra en la tabla 9 y 10. Entre el 10 y 13 % de los HAPs fueron retenidos o impregnados en los soportes Mutag Biochip. De acuerdo con la suma de las concentraciones de las muestras líquidas durante los 10 días de muestreo y para cada tratamiento, estos fueron menos del 0.1 % del total de los HAPs comprobando que la mayoría de los HAPs, fueron volatilizados o precipitados.

Tabla 9. Tabla de los pesos del fenantreno identificados en la cinética de degradación.

Fenantreno	{ } Inicial	{ } Líquido	{ } Soporte	{ } Total de los muestreos	{ } Volatilización
C1	160 000 µg (100 %)	90 896 µg (57 %)	0 µg (0 %)	7 µg (<0.1 %)	69 097 µg (43 %)
C2	160 000 µg (100 %)	86 214 µg (54 %)	18 969 µg (12 %)	18 974 µg (12 %)	69 097 µg (43 %)
CB	160 000 µg (100 %)	75 353 µg (47 %) <u>±10472</u>	16 544 µg (10 %) <u>±1179</u>	16 549 µg (10 %) <u>±127</u>	69 097 µg (43 %)
CN	160 000 µg (100 %)	52 940 µg (33 %) <u>±18702</u>	18 485 µg (12 %) <u>±1247</u>	18 519 µg (12 %) <u>±124</u>	69 097 µg (43 %)

En la Tabla 9 se muestra los resultados de la dispersión del fenantreno, la volatilización fue aproximadamente del 43 %. Como se había mencionado antes este porcentaje se calculó de acuerdo al balance de peso del tratamiento C1 sin soporte sin microorganismos debido a la ausencia de soporte y biopelículas que pudiera influir en la degradación del fenantreno. El porcentaje de fenantreno entre cada tratamiento que se precipito en la fase líquida fue entre el 33 y 57 %. Debido a la naturaleza fisicoquímica del fenantreno este es molecularmente más pesado que el acenafteno (174 y 154, respectivamente), es decir que la solubilidad en agua explicaría porque se

obtuvieron entre 7 y 12 % entre cada tratamiento en la columna de {} total de los muestreos de la Tabla 9 y porque los cristales de fenantreno estaban más agrupados y más fáciles de obtener en los 15 ml de los muestreos diarios. Cabe mencionar que su interacción con el soporte Mutag Biochip sería un punto interesante a analizar para entender su comportamiento.

Tabla 10. Tabla de los pesos del fluoranteno identificados en la cinética, soporte, líquido y peso degradado por las biopelículas.

Fluoranteno	{ } Inicial	{ } Líquido	{ } Soporte	{ } Total de los muestreos	{ } Volatilización
C1	160 000 µg (100 %)	97 946 µg (61 %)	0 µg (0 %)	206 µg (<0.1 %)	61 848 (39 %)
C2	160 000 µg (100 %)	95 486 µg (60 %)	19 851 µg (12 %)	122 µg (<0.1 %)	61 848 (39 %)
CB	160 000 µg (100 %)	88 635 µg (55 %) ±8559	17 105 µg (11 %) ±962	186 µg (<0.1 %) ±130	61 848 (39 %)
CN	160 000 µg (100 %)	68 768 µg (43 %) ±20067	19 736 µg (12 %) ±638	1 249 µg (1 %) ±130	61 848 (39 %)

Comparando la tabla 10 con los resultados antes discutidos del fenantreno, explicaría porque la mayoría de la presencia del fluoranteno se encontró precipitado en la fase líquida, de hecho, este hidrocarburo represento su concentración entre 43 a 60 % siendo el hidrocarburo con mayor presencia en el fondo del reactor lo cual limitaría en estudios posteriores la biodisponibilidad para las biopelículas y bacterias degradadoras en general. De los tres hidrocarburos este fue el que menos se volatilizó con un 39 % y obteniendo menos del 0.1 % de la {} total de fluoranteno.

5.5. Validación del método de extracción

Se realizó una curva de calibración estándar para cada hidrocarburo, con la cual se obtuvo las siguientes ecuaciones $Y = 2.4058 \times 10^6 X - 960082$ para acenafteno, $Y = 2.34269 \times 10^6 X - 5.73093 \times 10^6$ para fenantreno y $Y = 1.086 \times 10^6 X + 1.90151 \times 10^6$ para fluoranteno; donde Y es la señal analítica (área del pico), X la concentración del hidrocarburo (ppm) y un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9986, 0.9984 y 0.9977 para acenafteno, fenantreno y fluoranteno, respectivamente; lo que indica una buena linealidad. Los porcentajes de recuperación se presentan en la Tabla 7, con tres diferentes niveles de concentración (1 ppm, 50 ppm y 200 ppm) de cada hidrocarburo.

Tabla 11. Resultados de recuperaciones de acenafteno, fenantreno y fluoranteno y su RSD con tres niveles diferentes de concentración.

Hidrocarburo	ppm	Medias (%)	RSD (%)
Acenafteno	1	57.05	3.81
	50	48.85	4.15
	200	30.59	3.99
Fenantreno	1	241.85	149.09
	50	54.27	6.47
	200	35.69	7.80
Fluoranteno	1	157.91	43.61
	50	55.79	8.52
	200	22.54	3.64

n=3; RSD: desviación estándar relativa.

Para el acenafteno, se obtuvieron porcentajes de recobro de entre el 30-58 % con una RSD inferior a 4.2 %, lo cual está fuera del rango aceptado de recuperación (80-112 %) y RSD (≤ 15 %).

Para el fluoranteno, se obtuvieron porcentajes de recobro de entre el 30-58 % con una RSD inferior a 44 %, lo cual está fuera del rango aceptado de recuperación (80-112 %) y RSD (≤ 15 %).

Para el fenantreno, se obtuvieron porcentajes de recobro de entre el 35-242 % con una RSD inferior a 150 %, lo cual está fuera del rango aceptado de recuperación (80-112 %) y RSD (≤ 15 %).

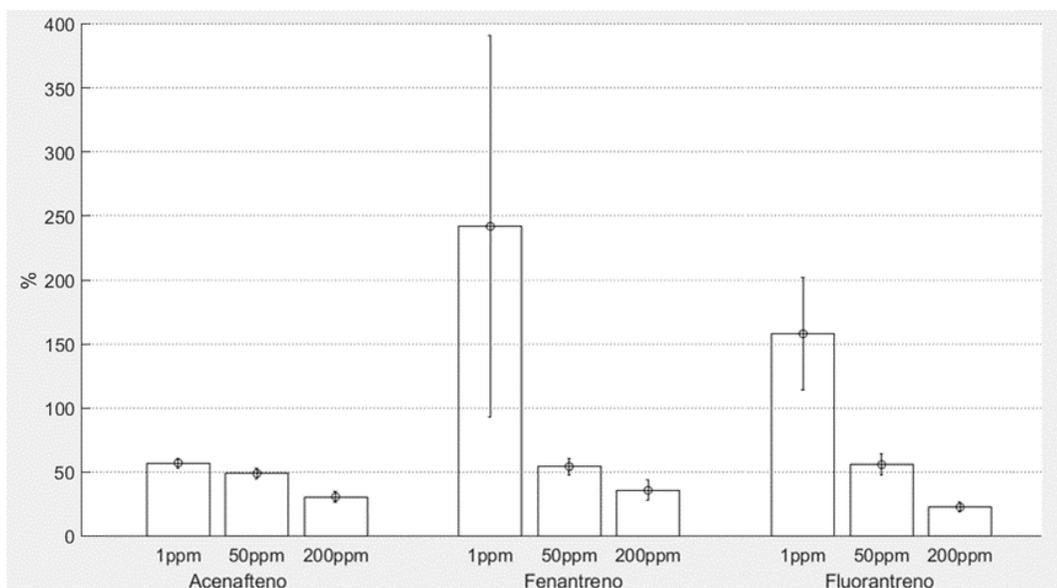


Figura 30. Gráfica de barras del porcentaje de recobro de acenafteno, fenantreno y fluoranteno a 1, 50 y 200 ppm.

En la Figura 30 se muestra la gráfica de barras de los porcentajes de recobro de los tres hidrocarburos, mostrando que el porcentaje de recobro está por fuera del rango de aceptación.

Gutiérrez (2014) y Poot (2016) realizaron la validación del método de extracción de sus experimentos, utilizando fenantreno como único hidrocarburo para realizar sus cinéticas de degradación y utilizaron las siguientes concentraciones: 0.3, 2.5 y 5 ppm, Gutiérrez (2014); y 40, 80 y 150 ppm, Poot (2016). Ambos utilizaron diferentes medios inorgánicos como soporte obteniendo más de 80 % de recobro. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo explicarían porque al usar el soporte Mutag Biochip de composición orgánica presenta una mayor impregnación no solo de fenantreno sino también de fluoranteno y acenafteno, que utilizar material inorgánico como soporte comparando, indicando que los porcentajes de recobro sean tan altos y por ende el método de extracción líquido-líquido no sea el mejor método de extracción en este tipo de sustrato orgánico. De acuerdo a lo reportado por López (2017) concentraciones mayores a 200 ppm de fenantreno tiene efectos inhibidores y pérdida de la capacidad degradadora. Comparándolo con los resultados de este trabajo se explicaría porque los carbones activados a concentraciones mayores de 600 ppm se

adhieren a este tipo de sustrato y en este trabajo la afinidad de los HAPs por moléculas orgánicas del soporte reduce la biodisponibilidad para los microorganismos.

Por ejemplo, el trabajo realizado por Fernández (2014) donde utilizó diferentes medios de soporte para el crecimiento de microorganismos como quitina y sílice logró obtener mejores resultados en el cromatógrafo e impregnación de fenantreno al sustituir esponja de poliuretano por carbón químicamente activado mejorando la biodisponibilidad del hidrocarburo para los microorganismos usando 100 mg/L del hidrocarburo. Comparando sus conclusiones con las de este trabajo podría decirse que el soporte inorgánico como el carbón activado mejora la impregnación del fenantreno sin reducir la biodisponibilidad y al ser inorgánico las moléculas del hidrocarburo no son tan adheridas como con un soporte orgánico como el soporte Mutag Biochip a base de resina de carbono.

Por otra parte, de acuerdo a los resultados el método de extracción líquido-líquido no sea el adecuado para determinar la degradación de los HAPs pues la mayoría de los HAPs se encontraron sedimentados y la homogenización no fue lograda dando como resultado la falta de precisión y exactitud de la toma de la muestra. Además, como reporta Gutiérrez (2014) utilizar un biosurfactante como el Tween 80 también compromete a los microorganismos a una inhibición de crecimiento, que puede relacionarse con la reducción de adhesión de la bacteria a las superficies hidrofóbicas. De hecho, obtuvo recuperaciones entre el 30-40% sin usar biosurfactante contra 80-90% al usarlo. Por ello, elegir el tipo de soporte inorgánico, más la correcta concentración y tipo de biosurfactante podría mejorar la metodología para una cinética de degradación, así como elegir concentraciones bajas como concluye López (2017) y a los resultados obtenidos por Poot (2016).

6. CONCLUSIONES

Se identificaron que las 3 cepas: A2A, C3C y D2A, pertenecen a las especies *Bacillus pumilus*, *Microbacterium keratanolyticum* y *Dietzia aurantiaca*, respectivamente. Mientras que las cepas L2F y L21 pertenecen a la especie *Halomonas sp.* Estas cepas conformaron el consorcio bacteriano con capacidad degradadora de acenafteno, fenantreno y fluoranteno.

La diversidad y porcentaje de abundancia del consorcio natural fue la siguiente: *Roseovarius sp.* 29 %, *Ruegeria sp.* 2 %, *Salipiger sp.* 5 %, *Marinobacter sp.* 1 %, *Idiomarina sp.* 2 %, *Alcanivorax sp.* 6 % y *Halomonas sp.* 31 %. A su vez, 15 % de la abundancia correspondió a bacterias pertenecientes al phylum Proteobacteria y 5 % de la abundancia correspondió a especies pertenecientes al dominio Bacteria.

De acuerdo a los resultados discutidos en la sección 5.4 y 5.5. se concluye que el volumen de muestreo para evaluar la degradación de los hidrocarburos por las biopelículas resulto poco representativo para el volumen del reactor debido a la metodología, la naturaleza orgánica del soporte Mutag Biochip, el tipo de agua y la fisicoquímica de los hidrocarburos.

De acuerdo a la evaluación de la degradación de HAPs por las biopelículas, aunque la cuantificación de la cinética no fue determinada, se obtuvieron crecimientos de las cepas antes mencionadas en presencia de fenantreno, acenafteno y fluoranteno durante la aclimatación alcanzando 200 ppm de cada hidrocarburo.

Finalmente, se cumplieron los objetivos específicos 1 y 3, parcialmente el segundo y obtuvimos información del acarreador Mutag Biochip implementado por primera vez en el tratamiento de HAPs en agua de mar. Por ende, el objetivo general de la tesis “Evaluar el uso de biopelículas para la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua de mar” fue cumplido parcialmente y determinamos recomendaciones para estudios futuros de la biodegradación de HAPs.

7. RECOMEDACIONES

Debido a la poca información que se tiene de los consorcios bacterianos de origen marino y sus mecanismos de degradación de acenafteno, fenantreno y fluoranteno, se recomienda realizar estudios de las rutas metabólicas que intervienen en el proceso para determinar el rol de las especies bacterianas y comprender la funcionalidad del microcosmos en los consorcios microbianos y sugerir estrategias que mejoren la degradación de los HAPs.

En estudios futuros se recomienda el uso de surfactantes (especialmente biosurfactantes) no tóxicos para las células, que permitan una mezcla homogénea de los HAPs en el medio líquido y evitar la formación de cristales, debido a que, por su naturaleza fisicoquímica, estos se precipitan, flotan en la columna del medio líquido (en menor concentración que en el precipitado) y se suspenden sobre la superficie del agua por la tensión superficial. Esto es importante porque la toma de la muestra para su cuantificación tiene que ser representativa para determinar la dispersión de los HAPs.

Si no puede usarse algún tipo de surfactante, se recomienda que la degradación biológica (Db) de los HAPs sea determinada por peso absoluto, diferenciando el peso inicial (Pi), con la suma de los pesos de impregnación de HAPs en el soporte (Pim) más el peso de los HAPs en líquido (Pl) más la volatilización (V).

$$Db = Pi - (Pim + Pl + V)$$

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel, H., y Mansour, M. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. "Egyptian Journal of Petroleum", 25(1), 107-123.
- Apiweb. (2010). Sistemas miniaturizados API. Apiweb BioMérieux. Disponible en: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_SistemasAPI.pdf Recuperado el 9 de diciembre de 2016.
- Arora, D. (2004). Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications. Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- Atlas, R. (2011). Oil Biodegradation and Bioremediation: A Tale of the Two Worst Spills in U.S. History. "Environmental Science & Technology", 45, 6709–6715.
- Ayil, E. (2015). Evaluación de las tasas de degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos HAPs (naftaleno, acenafteno y fluoranteno) en agua de mar sintética por dos consorcios microbianos natural y mixto. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Yucatán, México.
- Bailey, P. y Bailey, C. (1998). Química orgánica: conceptos y aplicaciones. USA: Pearson Educación. USA.
- Betancourth, M., Botero, J. y Rivera, S. (2004). Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. "Colombia Médica", 35(3), 34-39.
- Bernd, M. (2016). Biofilm carriers / MBBR carrier media and their respective diffusion depth. "Multi Umwelttechnologie AG", 1-3.
- Botello, A., von Osten, J., Gold, G. y Agrazg, C. (2005). Golfo de México. Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. 2ª edición, Campeche: Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología, México.
- Bueno, J., Sastre, H. y Lavin, A. (2003). Contaminación e Ingeniería Ambiental. Una visión desde la química. Paraninfo, Madrid, España.
- Carrillo, A. (2009). Evaluación de la contaminación por hidrocarburos en la zona costera de Progreso. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Yucatán, México.
- CDC, A. (2017). Resumen de Salud Pública: Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) PHS | ATSDR. Disponible en: https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs69.html Recuperado el 14 de marzo de 2017.

- Clesceri, L., Greenberg, A. y Trusell, R. (1989). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 17ª edición, APHA-AWWA-WPCF, Maryland, USA.
- Eriksson, M., Dalhammar, G. y Mohn, W. (2002). Bacterial growth and biofilm production on pyrene. "Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology", 40(1), 21-27.
- Flemming, H. (1991). Biofouling in water treatment. Biofouling and Corrosion in Industrial Systems. Springer-Verlag, Stuttgart, Alemania.
- Folwell, B., McGenity, T. y Whitby, C. (2016). Biofilm and Planktonic Bacterial and Fungal Communities Transforming High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. "Applied and Environmental Microbiology", 82(8), 2288 –2299.
- García, P., Allende, F., Legarraga, P., Huilcaman, M. y Solari, S. (2012). Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: Una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI. "Revista Chilena de Infectología", 29(3): 263-272.
- García, K. (2016). Inmovilización de un consorcio microbiano en soportes para la degradación de fenantreno en agua de mar. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Yucatán, México.
- García, K., Moreno, E., Hernández, A., Corona, G., Giacomán, G. y Ponce, C. (2016). Degradation of Phenanthrene by Natural Consortia in Seawater. "Romanian Biotechnological Letters", 21(1), 11194-11200.
- Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta, T. y Ahn, Y. (2016). Current State of Knowledge in Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. "Frontiers in Microbiology", 7(1369), 1-27.
- Gray, W., Pinto, P. y Pathak S. (1963). Growth of Fungi in Sea Water Medium. "Applied and Environmental Microbiology", 11(6), 501-505.
- Gutiérrez, C. (2014). Evaluación de la capacidad degradadora de fenantreno en agua de mar por cepas puras. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Yucatán, México.
- Habe, H. y Omori, T. (2003). Genetics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism in Diverse Aerobic Bacteria. "Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry", 67(2), 225-243.
- Haritash, A. y Kaushik, C. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. "Journal of Hazardous Materials", 169(3), 1-15.
- Jiménez, L. (2009). Caracterización biológica del biofouling marino mediante métodos moleculares. Aislamiento y determinación de actividad quorum

- sensing de las especies implicadas en el proceso. Tesis de doctorado, Universidad de Cádiz, Potugal.
- Jürgen, B. (2014). The right choice of biofilm carrier media used in MBBR-Technology. "Multi Umwelttechnologie AG", 1-4
- Kulshreshtha, S., Mathur, N. y Bhatnagar, P. (2014). Mushroom as a product and their role in mycoremediation. "Applied Microbiology and Biotechnology Express", 4(29), 1-7.
- Li, M. y Pei, Q. (2005). Antagonistic antimicrobial activity of marine fungi and bacteria isolated from marine biofilm and seawaters of Hong Kong. "Aquatic Microbial Ecology", 38, 231–238.
- López, A. (2017). Efecto de las concentraciones de fenantreno sobre el crecimiento de un consorcio bacteriano. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Yucatán, México.
- Lorenzo, V. (2006). Blueprint of an oil-eating bacterium. "Nature Biotechnology", 24(8), 952-953.
- Lyman, J. y Fleming, R. (1940). Composition of sea water. "Journal of Marine Research", 3, 134-146.
- Mangwani, N., Kumari, S. y Das, S. (2015). Involvement of quorum sensing genes in biofilm development and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a marine bacterium Pseudomonas aeruginosa N6P6. "Environmental Biotechnology", 99(23), 10283-10297.
- Mangwani, N., Kumari, S. y Das, S. (2017). Marine Bacterial Biofilms in Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Under Terrestrial Condition in a Soil Microcosm. "Pedosphere", 27(3), 548–558.
- Mapelli, F., Scoma, A., Michoud, G., Aulenta, F., Boon, N., Borin, S. y Daffonchio, D. (2017). Review Biotechnologies for Marine Oil Spill Cleanup: Indissoluble Ties with Microorganisms. "Trends in Biotechnology", 35(9), 860-870.
- Mastandrea, C., Chichizola, C., Ludueña, B., Sánchez, H., Álvarez, H. y Gutiérrez, A. (2005). Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. "Acta bioquímica clínica latinoamericana", 39(1), 27-36.
- McGenity, T., Folwell, B., McKew, B. y Sanni, G. (2012). Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. "Aquatic Biosystems", 8(10), 1-19.
- Nahuat, M. (2006). Evaluación de la contaminación por hidrocarburos en los sedimentos de las lagunas de Bocas de Dzilam y Celestún, Yucatán. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Yucatán, México.

- NCBI-Acenaphthene. (2017). NCBI-Acenaphthene. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6734> Recuperado el 26 de abril de 2017.
- NCBI-Fluoranthene. (2017). NCBI-Fluoranthene. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9154> Recuperado el 26 de abril de 2017.
- NCBI-Phenanthrene. (2017). NCBI-Phenanthrene. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/995> Recuperado el 26 de abril de 2017.
- Orozco, C., Pérez, A., González, M., Rodríguez, F. y Alfayate, J. (2003). Contaminación ambiental. Una visión desde la química. Thomson, Madrid, España.
- Passarini, M., Rodrigues, M., da Silva, M. y Sette, L. (2011). Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. "Marine Pollution Bulletin", 62(2), 364-370.
- Ponce, G. y Botello, A. (2005). Niveles de Hidrocarburos en el Golfo de México. En "Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias", Botello (Coordinador), 2da Edición. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología, México, 269-298.
- Poot, O. (2016). Evaluación de la capacidad degradadora de fenantreno en afua de mar por un consorcio mixto en un reactor de lecho fluidizado. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Yucatán, México.
- Pothuluri, J. y Cerniglia, C. (1994). Microbial Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. En "Biological degradation and bioremediation of toxic chemicals" Chaudhry (Editor), Dioscorides Press, Portland, Oregon, 92-147.
- Río, B. (1999). Eliminación del biofouling en intercambiadores de calor-condensadores que minimicen el impacto ambiental en el medio marino. Tesis de Doctorado. Universidad de Cantabria. España.
- Rittmann, B. y McCarty, P. (2001). Environmental Biotechnology: Principles and Applications. McGraw-Hill, Singapore.
- Rojas, R., Narváez, J., Zamudio, M. y Mena, E. (2008). A Simple Silica-based Method for Metagenomic DNA Extraction from Soil and Sediments. "Molecular Biotechnology", 40(1), 13-17.
- Salazar, L. (2008). Evaluación de la toxicidad de hidrocarburos aromáticos policíclicos en un sistema acuático y su aplicación en la ponderación de evidencias. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, México.

- Shukla, S., Mangwani, N., Rao, T. y Das, S. (2014). Biofilm-Mediated Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. En "Microbial Biodegradation and Bioremediation", Das, S. (editor), Elsevier Inc., 203-232.
- Simister, R., Poutasse, C., Thurston, A., Reeve, J., Baker, M. y White, H. (2015). Degradation of oil by fungi isolated from Gulf of Mexico beaches. "Marine Pollution Bulletin", 100(1), 327-333.
- Singh, R., Paul, D. y Jain, R. (2006). Biofilms: implications in bioremediation. "Trends in Microbiology", 14(9), 388-396.
- Siqueira, V., Oliveira, H., Santos, C., Paterson, R., Gusmão, N. y Lima, N. (2011). Filamentous Fungi in Drinking Water, Particularly in Relation to Biofilm Formation. "International Journal of Environmental Research and Public Health", 8(2), 456-469.
- Siqueira, V., Oliveira, H., Santos, C., Paterson, R., Gusmão, N. y Lima, N. (2013). Biofilms from a Brazilian water distribution system include filamentous fungi. "Canadian Journal of Microbiology", 59(3), 183–188.
- Stellman, J. (1998). Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. Subdirección General de Publicaciones. Madrid, España.
- Sstti.ua.es. (2017). ANÁLISIS ELEMENTAL. Disponible en: <https://sstti.ua.es/es/instrumentacion-cientifica/unidad-de-rayos-x/analisis-elemental.html> Recuperado el 28 de diciembre de 2017.
- Multi Umwelttechnologie AG. (2018). Mutag BioChip 25™. Disponible en: <https://mutag.de/en/information-en> Recuperado el 5 de enero de 2018.
- Ukiwe, L., Egereonu, U., Njoku, P., Nwoko, C. y Allinor, J. (2013). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Degradation Techniques: A Review. "International Journal of Chemistry", 5(4), 43-55.
- Valenzuela, I., Gold, G. y Ceja, V. (2005). Hidrocarburos en Agua y Sedimentos de la Laguna de Chelem y Puerto Progreso, Yucatán, México. En "Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias", Botello (Coordinador), Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología, México, 311-328.
- Varjani, S. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. "Bioresource Technology", 277-286.
- Verbruggen, E. (2012). Environmental risk limits for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) For direct aquatic, benthic, and terrestrial toxicity. National Institute for Public Health and the Environment. (RIVM report 607711007/2012), Paises Bajos.

- WFD. (2017). Priority substances under the Water Framework Directive. European Commission. Disponible en: http://ec.europa.eu/environment/water/water-dangersub/pri_substances.htm#top-page Recuperado el 5 de noviembre de 2017.
- Widdowson, M., Shearer, S., Andersen, R. y Novak, J. (2005). Remediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Compounds in Groundwater Using Poplar Trees. "Environmental Science & Technology", 39(6), 1598-1605.
- Zupanc, M., Kosjek, T., Petkovšek, M., Dular, M., Kompare, B., Širok, B., Blažeka, Z. y Heath, E. (2013). Removal of pharmaceuticals from wastewater by biological processes, hydrodynamic cavitation and UV treatment. "Ultrasonics Sonochemistry", 20(4), 1104-1112.