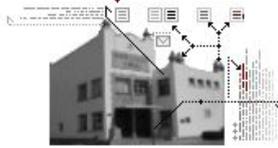


INSTITUTO TECNOLÓGICO DE DURANGO

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA



PROCOLO DE PROYECTO DE TESIS

NOMBRE DEL PROYECTO:

**“Biorremediación de un Efluente Contaminado
Con HTP`s en un Reactor Batch Heterogéneo,
Empleando Partículas Biocatalizadoras.”**

Presenta:

Ing. Jaime Javier Gómez Díaz

02040774

Director:

Dr. Joaquín Pinto Espinoza.

Asesor:

Dra. Adriana Martínez Prado.

Asesor:

Dr. Carlos Francisco Cruz Fierro.

Victoria de Durango, Dgo. México

Junio del 2008

ÍNDICE DE CONTENIDO.

Introducción	2
Justificación.	3
Objetivos.	4
Hipótesis.	5
1. Marco Teórico.	5
1.1 Contaminación del Agua	5
1.2 Contaminación por hidrocarburos.	6
1.3 Características del Hidrocarburo.	6
1.4 Biorremediación.	7
1.5 Aspergillus sp.	9
1.6 Flavobacterium sp.	10
1.7 Efluente.	11
2. Materiales y Métodos.	12
2.1 Biorremediación.	12
2.2 Aislamiento de la Bacteria y el Hongo.	12
2.3 Aislamiento y conservación de los Microorganismos	13
2.4 Reproducción y Conservación de Flavobacterium sp	13
2.5 Producción de Partículas de Alginato.	14
2.6 Pruebas de Degradación.	15
2.7 Diseño de Experimentos.	15
3. Cronograma de Actividades.	16
Referencias Bibliográficas.	18

INTRODUCCIÓN.

Fugas y derrames accidentales ocurren durante la manipulación de hidrocarburos de petróleo, ya sea combustible para maquinaria o restos de aceite quemado de los talleres de maquinas en las empresas. De esta manera los hidrocarburos pueden llegar a suelos y mantos acuíferos y así contaminar severamente a estos.

El diesel es una compleja mezcla que consiste básicamente de parafinas, olefinas, e hidrocarburos aromáticos, y en pequeñas cantidades moléculas que contienen azufre, nitrógeno, metales oxígeno, etc. Los aceites de diesel están compuestos de moléculas con 8-40 átomos de carbono y son usualmente mas pesadas, viscosas y menos volátiles que la gasolina.

Reducir las concentraciones de hidrocarburos en un medio contaminado es un reto significativo. Métodos mecánicos y químicos poseen efectividad limitada y pueden ser muy costosos, Una de las prácticas más comunes que se ha realizado en el pasado, consiste en la utilización de encapsuladores para estabilizar presas de crudo. Estos productos absorben el hidrocarburo y lo retienen en su estructura interna. Pero, la mayoría de los encapsuladores no contienen algún componente que lleve a cabo la biodegradación con el fin de descomponer el hidrocarburo encapsulado. Varias investigaciones han estudiado el uso de microorganismos para descomponer productos de petróleo y han demostrado ser una tecnología alternativa muy prometedora.

Para este estudio a el proceso de encapsulamiento se le da otra perspectiva, ya que como se menciona anteriormente se buscaba encapsular a el hidrocarburo, pero en este caso se busca encapsular a los microorganismos capaces de llevar a cabo la degradación de el hidrocarburo, y así disminuir la concentración del contaminante. El encapsulamiento se pretende en partículas de alginato. La actividad microbiana es afectada por factores ambientales incluyendo fuentes de energía, donadores y aceptores de electrones, nutrientes, pH y temperatura. Estos parámetros influyen que tan rápidamente los microorganismos se adaptan a la disponibilidad de sustratum [P.A. Viera 2006].

El termino biorremediación se define como el proceso de aceleración de la tasa de degradación natural de contaminantes por la adición de fertilizantes, para la provisión de nitrógeno y fósforo.

La meta de este estudio es adaptar dos cultivos mixtos extraídos de un suelo que fue contaminado con aceite, diesel y gasolina, mantener los cultivos en sus condiciones óptimas, encapsularlos en partículas de alginato y así poder remediar un efluente contaminado con hidrocarburos.

JUSTIFICACIÓN

La actividad del ser humano ha sobrepasado a la capacidad de la naturaleza de degradar los contaminantes de manera natural. Por lo tanto si nosotros contaminamos nosotros debemos de buscar la manera de remediar el daño tan severo que le estamos causando a nuestro planeta.

En México existen sitios contaminados con HTP's, causados por muchas razones, los cuales presentan un grave riesgo tanto para los seres humanos como para la flora y fauna locales. De esta manera el contaminante pasa a mantos acuíferos los cuales pueden ser para consumo humano,

Las contaminaciones pueden presentarse de dos formas generales: puntuales y sistemáticas. Las primeras ocurren de manera fortuita en los cuerpos de agua donde generalmente no hay presencia de hidrocarburos. Las segundas son habituales y caracterizan a aquellas aguas que son contaminadas por la actividad antrópica que en ellas se realiza. Por otro lado, las fuentes de la contaminación pueden ser simples o múltiples, y verter al medio uno o varios componentes del petróleo.

Este tipo de contaminación produce un cambio en las características organolépticas del agua que induce al rechazo de los consumidores, y su ingestión representa un riesgo para la salud; asimismo, el ecosistema puede sufrir afectaciones debidas al impacto negativo de estos contaminantes sobre sus diferentes componentes.

Las tecnologías de biorremediación consisten en el uso de microorganismos naturales (levaduras, hongos o bacterias) para descomponer o degradar sustancias

HIPÓTESIS.

Se lograra biodegradar el diesel de un efluente contaminado, a niveles aceptados por las regulaciones nacionales (NOM 138 de la SEMARNAT 2003), empleando partículas biocatalizadoras, en reactores batch.

1. MARCO TEÓRICO.

1.1 Contaminación de Agua.

Es cualquier modificación, natural o artificial, que directa o indirectamente cambia la calidad del agua y perturba o destruye los recursos naturales. Puede causar riesgos sanitarios, reducir el bienestar del hombre y de las comunidades acuáticas y perjudicar el mejor uso del agua actual o potencial. La contaminación no se refiere sólo a desechos tóxicos, ya que desechos no tóxicos como materia orgánica (por ej. residuos cloacales, desperdicios de frigoríficos) pueden afectar seriamente los cursos de agua alterando completamente sus características (Ceamse, 1985).

Los factores contaminantes son diversos y pueden agruparse de la siguiente forma:

1. Sustancias orgánicas biodegradables: organismos en descomposición, heces humanas y de animales.
2. Sustancias orgánicas tóxicas son producidas por el hombre, y en general no son biodegradables. Ej. Biocidas, anilinas, hidrocarburos, etc.
3. Sustancias inorgánicas tóxicas: originadas por la industria y la minería. Ej. Metales pesados, dispersantes (en la explotación petrolera), etc.
4. Sólidos en suspensión: sedimentos que llegan por escorrentía provenientes de la construcción, industria cerámica, dragado, etc.
5. Agentes patógenos: desechos provenientes de unidades sanitarias no esterilizados.
6. Térmicos: vertido de agua a temperaturas superiores a las del cuerpo de agua receptor. Ej. En la industria, centrales nucleares, explotación de petróleo, etc.
7. Agentes radiactivos: provenientes de la energía nuclear o tecnologías afines.

Las vías por las cuales estos factores pueden llegar a las aguas continentales son, a través de la atmósfera (Ej. plomo y mercurio), por precipitación (lluvia ácida), por

entrada de cursos de agua tributarios, por aguas subterráneas, por escorrentía, o por liberación directa del hombre al cuerpo de agua. Los contaminantes no sólo están en suspensión o disueltos en el agua, sino que también se acumulan en el sedimento y en las comunidades que allí viven (Margalef, 1991).

1.2 Contaminación por Hidrocarburos.

La contaminación por petróleo se produce por su liberación accidental o intencionada en el ambiente, provocando efectos adversos sobre el hombre o sobre el medio, directa o indirectamente.

La contaminación involucra todas las operaciones relacionadas con la explotación y transporte de hidrocarburos, que conducen inevitablemente al deterioro gradual del ambiente. Afecta en forma directa al suelo, agua, aire, y a la fauna y la flora

Efectos sobre el agua: en las aguas superficiales el vertido de petróleo u otros desechos produce disminución del contenido de oxígeno, aporte de sólidos y de sustancias orgánicas e inorgánicas. En el caso de las aguas subterráneas, el mayor deterioro se manifiesta en un aumento de la salinidad, por contaminación de las napas con el agua de producción de petróleo de alto contenido salino. Si la zona de explotación es costera o mar adentro el derrame de hidrocarburos produce daños irreversibles sobre la fauna marina (Hernández y Gonzales, 1991).

1.3 Características de los hidrocarburos.

Los hidrocarburos son compuestos formados por átomos de carbono e hidrógeno, de gran abundancia en la naturaleza, presentes principalmente en el petróleo. Se considera a los hidrocarburos de petróleo como una mezcla líquida compleja de gases, líquidos y sólidos, existiendo pequeñas cantidades de mezclas de nitrógeno, oxígeno y azufre, además de contener compuestos de hierro, níquel, vanadio y otros metales. De manera general, el petróleo tiene una proporción de 76 a 86% de carbono y de un 10 a 14% de hidrógeno. Los hidrocarburos se clasifican de la siguiente forma (Wood, 1974):

- Hidrocarburos Biogénicos, Estos son sintetizados por casi todas las plantas, animales terrestres y marinos. La síntesis de este tipo de hidrocarburos está

controlada por rutas metabólicas, lo cual trae como resultado mezclas de compuestos de limitada complejidad estructural relacionada directamente con la función biológica específica. Éstos pueden ser biosintetizados por los organismos o bien pueden ser ingeridos con el alimento y alterados después de su ingestión (Bedair *et al.*, 1992).

- *Hidrocarburos Antrópicos*, Son aquellos que son introducidos como resultado de cualquier tipo de actividad humana. Los procesos de combustión industrial que contribuyen con niveles mucho más altos debido principalmente al humo generado por carbón, combustibles fósiles y petróleo refinado, las descargas de aguas municipales, las actividades de transporte y los derrames son algunas de las principales fuentes de estos contaminantes (Blideman, 1990).
- *Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's)*, constituyen contaminantes orgánicos relacionados con las actividades humanas. Los compuestos que más conciernen de los hidrocarburos del petróleo y de la pirolisis de combustibles son los hidrocarburos aromáticos policíclicos, sus homólogos alquil y los HAP's sustituidos con sulfuro o nitrógeno. Muchos de esos compuestos son estables y altamente tóxicos, algunos son potentes carcinógenos y otros mutagénicos. Los HAP's están formados por dos o más anillos de benceno fusionados, los cuales difieren en el número y posición del anillo aromático (PEMEX, 1988).

1.4 Biorremediación.

Se define como biorremediación al proceso de aceleración de la tasa de degradación natural de hidrocarburos por adición de fertilizantes para provisión de nitrógeno y fósforo (Ercolli & Moon, 2001).

La descomposición microbiana del petróleo y de sus derivados es de considerable importancia económica y ambiental. El petróleo es una rica fuente de materia orgánica y los hidrocarburos que contienen son rápidamente atacables por diferentes microorganismos en condiciones aeróbicas. No resulta extraño, por tanto, que en contacto con el aire y la humedad sea atacado por los microorganismos. El termino biorremediación aquí hace referencia a la eliminación de los hidrocarburos totales del petróleo (HTP's) mediante el uso de microorganismos. La importancia de la biorremediación para eliminar los vertidos de hidrocarburos ha sido ampliamente

demostrada en los últimos años en varios casos en que se produjeron vertidos considerables en distintas zonas.

El tratamiento biológico de efluentes contaminados involucra el uso de microorganismos y/o vegetales para la degradación de los contaminantes orgánicos. La actividad biológica altera la estructura molecular del contaminante y el grado de alteración determina si se ha producido biotransformación o mineralización. La biotransformación es la descomposición de un compuesto orgánico en otro similar no contaminante o menos tóxico, mientras que la mineralización es la descomposición a dióxido de carbono, agua, y compuestos celulares (Schroeder *et al.*, 1991).

Los microorganismos descomponen los contaminantes orgánicos en productos inocuos, principalmente dióxido de carbono y agua. Una vez degradados los contaminantes, la población de microorganismos se reduce porque ha agotado su fuente de alimento. Las poblaciones pequeñas de microorganismos sin alimentos o los microorganismos muertos no presentan riesgos de contaminación.

Algunos microorganismos pueden utilizar hidrocarburos para su crecimiento como única fuente de carbono, entre ellos se incluyen bacterias, actinomicetos, levaduras y mohos. Los gérmenes producen una serie de catalizadores biológicos denominados enzimas, que se liberan al exterior de la célula y atacan las moléculas de hidrocarburo transformándolas en formas más fácilmente asimilables.

El proceso de biorremediación se puede dividir en tres niveles (A. Salinas-Martínez *et al.*):

1. a través de atenuación natural, los contaminantes son reducidos por microorganismos nativos sin ninguna aumentación por el hombre.
2. la bioestimulación es empleada, donde nutrientes y oxígeno son aplicados al sistema para mejorar su efectividad y acelerar la biodegradación.
3. durante la bioaumentación, se añaden microorganismos al sistema, estos suelen ser más eficientes que la flora nativa para degradar los contaminantes objetivo.

El crecimiento celular se define como el aumento ordenado de todos los componentes químicos que llevan a un incremento de los constituyentes y

estructuras celulares. Los *nutrientes*, a partir de los cuales los microorganismos sintetizan sus principales biomoléculas y obtienen su energía, están disueltos en agua, razón por la cual el crecimiento celular depende de la disponibilidad de agua. Los nutrientes requeridos en grandes cantidades son denominados *macronutrientes* (C, H, O, N, P, S, K, Ca, Fe y Na) mientras que los *micronutrientes* son necesarios en cantidades traza (Cr, Co, Cu, Mn, Mo, Ni, Se, W, V, Zn), además de los minerales, necesitan muy pequeñas cantidades de nutrientes de naturaleza orgánica llamados *factores de crecimiento* (vitaminas, aminoácidos, purinas y pirimidinas).

La degradación de hidrocarburos alifáticos saturados es un proceso básicamente aeróbico, el oxígeno es necesario para iniciar el ataque microbiano a la molécula, mientras que la degradación de hidrocarburos alifáticos insaturados puede efectuarse en forma aeróbica y anaeróbica, al igual que los aromáticos (Ercolli & Moon, 2201).

1.5 *Aspergillus sp.*

El *Aspergillus sp.* es un hongo; organismo heterótrofo que poseen paredes celulares rígidas. Algunos son unicelulares, otros son pluricelulares y presentan alguna diferenciación en sus partes estructurales. Varían en tamaño y forma desde las levaduras microscópicas unicelulares hasta los hongos microscópicos (mohos) y hasta setas gigantes pluricelulares.

Los hongos se desarrollan en conidias (esporas) que sirven para la producción de un nuevo individuo de la misma especie, están destinadas a la diseminación y reproducción; La primera fase del desarrollo de una espora es la absorción de agua, con el aumento consiguiente de la misma (germinación) que se alarga rápidamente. Una espora unicelular puede dar origen a más de un filamento, mientras que en algunas esporas multicelulares cualquier célula puede desarrollarse por su cuenta y hacer que broten de la superficie unos o más filamentos. Cada uno de estos filamentos se denomina hifa, se desarrollan formando conidióforos que dan lugar a conidias.

El género *Aspergillus* fue descrito por primera vez por Micheli en 1729, que lo denominó con este nombre por el parecido de la cabeza conidial con un

"aspergillum" (instrumento religioso utilizado para dispersar el agua bendita), son microhongos filamentosos hialinos, de los que se conoce unas 900 especies.

En medios de cultivo sólidos forman colonias de crecimiento rápido, de textura variable (aterciopelada, granular, algodonosa) y con muy variadas coloraciones: blanco o verde-azulado (*A. fumigatus*), verde-amarillento (*A. flavus*), negro (*A. niger*), marrón (*A. terreus*), etc. Esta coloración aparece casi siempre en todas las estructuras aéreas, tanto en el micelio como en las cabezas conidiales (Smith, 1963)

En medio líquido se pueden encontrar tres tipos de morfologías: una dispersa en forma de hifas sueltas, otra dispersa en forma de agregados de hifas y por último una morfología discreta en forma de agregados compactos denominados "pellets"

El tamaño de los pellets puede variar desde pocos cientos de micras hasta varios centímetros según las condiciones del cultivo.

1.6 *Flavobacterium sp.*

Género bacteriano perteneciente al grupo de las flavobacterias organotrofas, es un género ampliamente distribuido en aguas y suelos. No ha sido encontrado en sedimentos de acuíferos profundos pero sí en las aguas que se extraen de ellos. Por esta razón, se duda si las *flavobacterias sp.* se encuentran naturalmente en un acuífero o simplemente colonizan el pozo luego de su perforación. Son bacilos que se caracterizan por falta de movilidad y producción de pigmentos de color amarillo y naranja. Son típicos de agua dulce y salada, alimentos, y plantas procesadoras.

Las bacterias son microorganismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria, conocida también como bipartición. Su tamaño puede variar desde 0.2 μm de diámetro hasta 40 μm (Mark, 2005).

Los principales tipos de formas que presentan las bacterias son: esférica, bastón alargado o espiral. Las bacterias de forma esférica se denominan *cocos* (redondeados, ovoides o elípticos); las de forma de bastón alargado se denominan *bacilos* (cilíndricos, fusiformes, etc.) y las de forma de bastón curvado se denominan *espirilos*. Aquellas bacterias cuya imagen proyectada sobre el plano tienen forma de coma, se llaman *vibrios*. Otras formas que pueden presentar las bacterias son filamentosa (ramificada o no), anillos y también estructuras con prolongaciones.

La curva de crecimiento de los microorganismos consta de cuatro fases, como a continuación se detalla (Figura 1)

- a) *Fase latencia o adaptación*: Cuando los microorganismos son inoculados en un medio líquido, experimenta un cambio de composición química antes de iniciar el crecimiento.
- b) *Fase de crecimiento exponencial*: Es el periodo donde cada célula se divide en 2 y así sucesivamente es la reproducción o crecimiento celular.
- c) *Fase estacionaria*: La velocidad de crecimiento disminuye y el crecimiento llega a detenerse.
- d) *Fase de muerte o decaimiento endógeno*: Las células bacterianas mantenidas en un estado en el que no hay crecimiento llegan a morir, consecuencia de diversos factores.

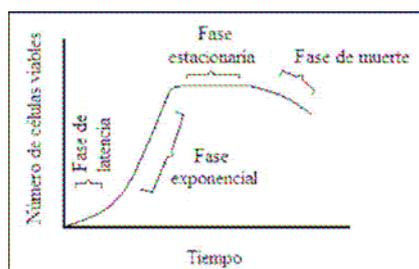


Figura 1. Curva de crecimiento bacteriano

1.7 Efluente.

Término empleado para nombrar a las aguas servidas con desechos sólidos, líquidos o gaseosos que son emitidos por viviendas y/o industrias, generalmente a los cursos de agua; o que se incorporan a estas por el escurrimiento de terrenos causado por las lluvias.

Los productos tóxicos presentes en los efluentes son muy variados, tanto en tipo como en cantidad, y su composición depende de la clase de efluente que los genera. Los desechos que contienen los efluentes pueden ser de naturaleza química y/o biológica.

En términos generales, los principales componentes de los efluentes según su origen son:

- **Industria metalúrgica:** metales tales como cobre, níquel, plomo, zinc, cromo, cobalto, cadmio; ácido clorhídrico, sulfúrico y nítrico; detergente.
- **Industria papelera:** sulfitos, sulfitos ácidos, materia orgánica, residuos fenólicos, cobre, zinc, mercurio.
- **Industria petroquímica:** hidrocarburos, plomo, mercurio, aceites, derivados fenólicos y nafténicos, residuos semisólidos.
- **Industrias de la alimentación:** nitritos, materia orgánica, ácidos, microorganismos, etc.
- **Industrias textiles:** sulfuros, anilinas, ácidos, hidrocarburos, detergentes.
- **Industrias del cuero (curtiembres):** cromo, sulfuros, compuestos nitrogenados, tinturas, microorganismos patógenos.
- **Industrias químicas (en general):** amplia variedad de ácidos orgánicos e inorgánicos, sales, metales pesados.
- **Instalaciones sanitarias:** microorganismos, jabones, detergentes.

Muchos de estos efluentes son emitidos a temperaturas superiores a la normal, constituyendo este factor un elemento más de contaminación. Estos aportes causan graves daños a la comunidad y al ecosistema. Los efluentes deben estar sometidos a un tratamiento tal que elimine su toxicidad y representa una obligación para quien los genera, debiendo por este motivo formar parte del proceso industrial que los produce (Ceamse, 1985).

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 Biorremediación.

Para desarrollarse, los microorganismos deben tomar del ambiente los nutrientes que requieren para la síntesis de su material celular y para la generación de energía, por lo tanto un medio de cultivo debe de tener los nutrientes necesarios en cantidades apropiadas a los requerimientos específicos de los microorganismos para los que ha sido ideado. Para el aislamiento, conservación y bioestimulación de este consorcio microbiano, se utilizara una Solución de Medio Mineral (SMM), descrito en la Tabla 1.

Tabla 1. Solución de medio mineral

Componentes	Concentración
K ₂ HPO ₄	1.5 g/L
KH ₂ PO ₄	1.5 g/L
NH ₄ NO ₃	2 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g/L
NaCl	1 g/L
Mezcla (FeSO ₄ + EDTA)	1 mL

2.2 Aislamiento de la Bacteria (*Flavobacterium*) y el Hongo (*Aspergillus*).

En un reactor (matraz de 1000 mL) se adicionarán 100 mL de medio mineral (SMM), 1 g de suelo contaminado y 1 mL de diesel como fuente de carbono. Después incubar el reactor a 30 °C y 150 revoluciones por minuto (rpm). Y esperar aproximadamente 8 días hasta tener crecimiento microbiano visible. .

Introducir un asa esterilizada en la suspensión del reactor para tomar una muestra de los microorganismos. Con ella hacer una serie de estrías paralelas sobre una placa de agar nutritivo solidificado en una caja petri, con el fin de aislar las colonias de microorganismos, incorporar un papel filtro impregnado con 1 ml de diesel (con el fin de que crezcan aquellos microorganismos que tomen como única fuente de carbono el diesel). Incubar las cajas petri a 30 °C por 7 días y después revisar el crecimiento microbiano.

2.3 Aislamiento y Conservación de los Microorganismos

a) Aislamiento.

Obtenidos el hongo y la bacteria, se procederá a realizar el aislamiento de los microorganismos, para asegurar una conservación confiable del cultivo mixto. La identificación del hongo y la bacteria fue hecha por Salinas Martínez (2005), cada microorganismo se sembrará en cajas petri, con agar nutritivo solidificado y papel filtro impregnado con 1 mL de diesel, las cajas se guardaron en una incubadora a 30 °C, en un periodo aproximado 15 días.

b) Conservación.

Para la conservación del cultivo mixto es solo dejar las cajas en un refrigerador para su conservación a - 4 °C, para evitar el crecimiento y el deceso de los microorganismos.

2.4 Reproducción y Conservación del *Flavobacterium* sp.

Teniendo conocimiento del tiempo en que empieza la fase exponencial de la bacteria, se cosecharan las células o cultivo y se obtendrán muestras criogénicas del *Flavobacterium*, como a continuación se detalla, para asegurar su conservación y uso posterior.

En 5 reactores batch (botellas Wheaton de 740 mL) agregar 100 mL de SMM, 1 mL de diesel y una asada de inóculo bacteriano, incubar los reactores a 30 °C y 150 rpm durante 96 horas. Para cosechar las células es necesario transferir el contenido de los reactores batch a tubos Corning de 50 mL para centrifuga, y someterlos a centrifugación a 6,000 rpm durante 10 minutos, después desechar el líquido sobrenadante. Posteriormente agregar 18 mL de SMM esterilizada para resuspender las bacterias concentradas del el fondo del tubo con la ayuda de un vortex (Vortex-Genie 2 Mixer, Daigger).

Repetir Este procedimiento varias veces hasta lograr la concentración deseada de células. De ahí se transfirieron 1000 µL de la suspensión concentrada de células a los tubos criogénicos de 2 mL de volumen y se les agregó 100 µL de DMSO (Dimethyl Sulfoxide), solución que ayuda a evitar el proceso de lisis en las células, y se almacenaron en un ultra congelador a una temperatura de - 80 °C para su conservación.

2.5 Producción de Partículas de Alginato.

Los procesos de microencapsulación son utilizados para obtener sistemas de liberación sostenida o controlada de principios activos. Además, ofrecen la ventaja de enmascarar olores y sabores desagradables, proteger frente a la oxidación, volatilidad o fotosensibilidad, y reducir la acción irritante gastrointestinal de algunos fármacos (Lamas, 1998).

En sus orígenes las técnicas de microencapsulación involucraban el uso de solventes orgánicos, lo cual no lo hacía apto para aplicaciones biológicas. En la década de los años 80, sustancias naturales comienzan a ser utilizadas, tales como proteínas (colágeno, gelatina) y polisacáridos (agar, alginato cálcico, carragenano),

los cuales tienen buena biocompatibilidad y han demostrado una rápida incorporación de los principios activos en los sistemas.

Las micropartículas de alginato cálcico son generalmente preparadas por dos métodos: a) por goteo de una solución de alginato de sodio en una solución de una sal de calcio; b) por gelificación del alginato en una emulsión A/O. Las partículas producidas por el primer método son generalmente grandes y el empleo de una técnica de goteo por jeringa no es aplicable para una escala industrial (Fundueuanu, 1998).

2.6 Pruebas de degradación.

Estas pruebas se realizaran en reactores batch (botellas Wheaton de 250 mL), las cuales se dispondrán de la siguiente manera, un 50% del volumen será del efluente contaminado con diesel a una concentración conocida o el efluente proveniente de un proceso de electrorremediación y una cantidad de partículas biocatalizadoras, el resto del volumen será de oxígeno por que como ya se sabe el proceso es aeróbico.

Se dejara correr el experimento por un periodo mayor a 200 horas por lo que ya se sabe de investigaciones pasadas.

2.7 Diseño de Experimentos.

Se requiere plantear varios experimentos, para conocer la capacidad de biodegradación del contaminante, los cuales se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 3. Experimentos a realizar.

# Exp.	SMM	Bacteria	Hongo	Diesel	O ₂	
1	+	+	+	+	+	
2	+	-	+	+	+	
3	+	+	-	+	+	
4	-	-	-	+	+	Control abiótico
5	-	+	+	+	+	Control
6	+	+	+	+	-	
7	+	+	+	-	+	Control -

Que se espera obtener con cada experimento:

#1.- es el experimento que se quiere realizar con los objetivos, primero si se logra degradar el diesel en el efluente, y segundo en caso de que se logre degradar algo, cuantificarlo.

#2y #3.- son para hacer una comparación entre los dos tipos de cultivo bacteria y hongo, y así conocer cual de ellos presenta mejores características para la degradación de diesel.

#4 y #5.- son dos experimentos de control, el primero para ver que al no tener ni hongo ni bacteria no se degrada nada del diesel, y el segundo para comprobar que tanto pueden degradar el hongo y la bacteria sin la SMM.

#6.- para corroborar lo que ya se sabe que este proceso es aeróbico y se requiere de presencia de O₂ para que el cultivo pueda degradar al diesel.

#7 Control negativo..

Los experimentos se planearan de manera de poder realizarlos en rectores de un volumen aproximando de 250 ml, y al final si se cuenta con los recursos necesarios, se realizara un experimento con un efluente proveniente de un proceso de electrorremediación.

Después de que se corran los experimentos se analizaran los resultados con el programa JMP 6.

3. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

En la Tabla 4 se presenta el cronograma de trabajo propuesto para efectuar este proyecto. Las actividades a realizarse se describen a continuación.

1. Revisión Bibliográfica. Llevar a cabo toda la investigación necesaria en publicaciones científicas, libros, internet, etc., para desarrollar el estado del arte que soportará esta Tesis.

2. Aislamiento Cultivo y Conservación de los Microorganismos. Esta actividad se realizara de acuerdo a lo descrito con anterioridad.

3. Pruebas Preliminares de Inmovilización de los Microorganismos en Alginato. Para esto se requiere de un dispositivo para la creación de las partículas de alginato, el cual fue ya desarrollado.

4. Producción de Partículas Biocatalizadoras.

Una vez teniendo las partículas de alginato se procederá a crear las partículas con microorganismos en su área superficial.

5. Implementación de Técnicas Analíticas. Aprender cuales y como se aplican las técnicas de análisis que serán necesarias para obtener los datos experimentales en cada experimento.

6. Fase Experimental. Llevar a cabo todas las corridas experimentales que están programadas para obtener los datos necesarios para obtener resultados de esta investigación de acuerdo a los objetivos impuestos.

7. Interpretación y Evaluación Estadística de los Resultados. Aplicar técnicas estadísticas a todos los resultados producto de las corridas experimentales para obtener patrones de comportamiento, ver la efectividad de cada proceso y formular conclusiones y posteriores recomendaciones.

8. Divulgación de Resultados en un Foro Técnico Científico. Exponer los resultados obtenidos ante un simposio, congreso o reunión académica correspondiente al área de investigación en la que se trabaja.

9. Publicación de un Artículo Científico. Elaborar un artículo científico donde se presenta todo el trabajo realizado y los resultados de éste.

10. Redacción de Tesis de Grado. Escribir la tesis en base a todo el trabajo realizado y con la cual se obtendrá el grado de maestro en ciencias en ingeniería química.

11. Defensa. Presentar una evaluación oral donde se presenta el trabajo concluido.

Tabla 4. Cronograma de Actividades.

Actividad	2008					2009					
	Ene. Feb.	Mar. Abr.	May. Jun.	Jul. Ago.	Sep. Oct.	Nov. Dic.	Ene. Feb.	Mar. Abr.	May. Jun.	Jul. Ago.	
1. Revisión bibliográfica.	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
2. Aislamiento cultivo y conservación de los microorganismos.	■	■									
3. Pruebas preliminares de inmovilización de los microorganismos en alginato.		■	■	■							
4. Producción de partículas biocatalizadoras.			■	■							
5. Implementación de técnicas analíticas.			■	■							
6. Fase experimental.					■	■	■				
7. Interpretación y evaluación estadística de los resultados.						■	■	■			
8. Divulgación de resultados en un foro Técnico Científico.						■				■	
9. Publicación de un artículo científico.										■	
10. Redacción de Tesis de Grado.				■	■	■	■	■	■	■	
11. Defensa.											■

BIBLIOGRAFÍA

Bedair F., Diezel E., Lirette P., & Pauquette G. (1992). Comparative study of five polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterial strains isolated from contaminated soils. *Can. J. Microbiol.* 43 (4): 368-77.

Bidleman C.E. (2003). Bioremediation of petroleum pollutants: Diversity and environmental aspects of hydrocarbon biodegradation. *BioSci* 1995; 5: 332-338.

CEAMSE, 1985. Residuos industriales peligrosos. Bs.As.

Ercolli S. O. & Moon S. H. (2001). Enhanced electrokinetic soil remediation for removal of organic contaminants, *environmental technology*, Cap. 21: 417-426.

Fundueanu G, Esposito E, Mihai D, Carpov A, Desbrieres J, Rinaudo M, Nastruzzi C. Preparation and characterization of Ca-alginate microspheres by a new emulsification method. *International Journal of Pharmaceutics* 1998.

Gómez Contreras N. (2007). "Reproducción de un cultivo mixto para remediar un suelo contaminado con hidrocarburos". Tesis de Licenciatura en Ingeniería Química. Instituto Tecnológico de Durango.

Hernández ,M.A. y Gonzales ,N. 1991. Recursos hídricos y ambiente. En: Elementos de política ambiental. Goin,F. y Goñi, R. Eds.H.Cámara de Diputados de la provincia de Buenos Aires, Argentina.

Lamas MC, Bregni C, Frías M, Velázquez R. Hydrogel microspheres for flutamide obtained by múltiple emulsions. S.T.P. Pharma Science 1998.

Marc V.C. (2005). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. Universidad de Barcelona Facultad de Biología, Departamento de Microbiología,

MARGALEF, R. 1991. *Ecología*. Omega, Barcelona. 951 págs

Página de Internet; <http://www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/terminos/Efluentes.htm>

P.A. Vieira, F.P. de Franca, v.L. Cardoso. "Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline." Elsevier. Journal of Hazardous Materials.

PEMEX (1988). El Petróleo. Gerencia de información y relaciones públicas. México

Schroeder A., Domínguez V., García H. (1999). Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico Mexicano. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Biológicas.

Smith, G., Rodriguez A, Rodriguez J.(1963) Introducción a la microbiología industrial. Ed. Acribia. Zaragoza (España). pp,443. Biblioteca fai.

Wood I. J. (1974). Prospección de contaminación de acuíferos por hidrocarburos. Geólogos. 1(6):5-8.