



**EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



Instituto Tecnológico de Boca del Río

“2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria”

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE BOCA DEL RÍO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**“EFECTO DE LA TEMPERATURA DE OPERACIÓN DE UN  
BIORREACTOR AIRLIFT EN LA DEGRADACIÓN DE  
HEXADECANO POR UN CONSORCIO MICROBIANO  
HIDROCARBONOCLASTA”**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA AMBIENTAL**

**PRESENTA**

**I.Q. BRENDA LIZETH GARCIA ESCOBEDO**

**DIRIGIDO POR**

**DRA. MARÍA DEL REFUGIO CASTAÑEDA CHÁVEZ**

**DR. MANUEL ALEJANDRO LIZARDI JIMÉNEZ**

**DICIEMBRE 2020**

**BOCA DEL RIO, VER**



Km. 12 Carretera Veracruz-Córdoba C.P.94290  
Boca del Río, Veracruz. Tel. (229) 690-5010 e-mail: dir01\_bdelrio@tecnm.mx  
www.tecnm.mx | www.bdelrio.tecnm.mx





“2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria”

**ACTA DE REVISIÓN DE TESIS**

**Número Registro: A-08012-150119**

En la ciudad de Boca del Río, Ver., siendo las 10:00 horas del día 23 del mes de noviembre de 2020 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Consejo del Posgrado de la Maestría en Ciencias en Ingeniería Ambiental del ITBOCA, para examinar la Tesis de Grado titulada:

**“EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA HIDRODINAMICA DE UN BIORREACTOR AIRLIFT DEGRADADOR DE HEXADECANO”**

Que presenta el (la) alumno(a):

**BRENDA LIZETH GARCÍA ESCOBEDO**

Aspirante al Grado de:

**Maestro en Ciencias en Ingeniería Ambiental**

Después de escuchar las opiniones sobre el documento escrito e intercambiar puntos de vista, los miembros de la Comisión manifestaron SU APROBACIÓN, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes para su defensa ante el jurado correspondiente.

**LA COMISIÓN REVISORA:**

**DRA. MARÍA DEL REFUGIO CASTAÑEDA CHÁVEZ**  
Director

**DR. MANUEL ALEJANDRO LIZARDI JIMENEZ**  
Co-Director

**DRA. FABIOLA LANGÓ REYNOSO**  
Asesor

**M.C. CHRISTIAN REYES VELASQUEZ**  
Asesor





“2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria”

Boca del Río, Ver., **23/NOVIEMBRE/2020**

Asunto: **CONSTANCIA DE  
NO INCONVENIENCIA**

**LIC. MAGALI DE LOURDES MARTÍNEZ CANALES**  
**JEFA DEL DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES**  
Presente.

**AT´N.LIC. SONIA CONCEPCIÓN SOLÍS SOLÍS**  
**GESTOR DE TITULACIÓN**  
Presente.

Por medio del presente, me permito hacer constar que el(a) candidato(a) a Maestro en Ciencias en Ingeniería Ambiental a la **C. BRENDA LIZETH GARCIA ESCOBEDO** de la generación agosto 2018 – julio 2020 con número de control **18990043**, cumplió con todos los requisitos para su liberación como tesista, mismos que incluyen la presentación del manuscrito final de tesis autorizado por su director de tesis **DRA. MARIA DEL REFUGIO CASTAÑEDA CHAVEZ**, y él envió del artículo derivado de su tesis de grado a una revista indexada.

Por lo anterior no tengo inconveniente en que realice los trámites correspondientes para el acto recepcional para la obtención del grado de Maestro en Ciencias, en la fecha y hora que defina el candidato con su Director de tesis.

Sin otro particular y para los fines legales que corresponda, quedo de usted.

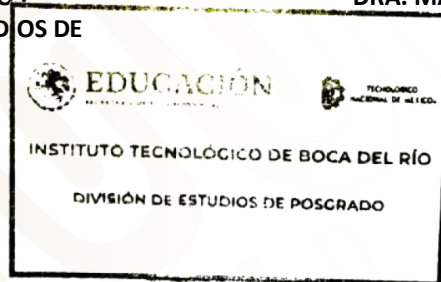
**ATENTAMENTE**  
*Excelencia en Educación Tecnológica®*  
*Por nuestros mares responderemos*

**Vo.Bo.**

**M.C. ANA LETICIA PLATAS PINOS**  
**JEFA DE LA DIVISION DE ESTUDIOS DE**  
**POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**DRA. MARIA DEL REFUGIO CASTAÑEDA CHAVEZ**  
**DIRECTOR DE TESIS**

c.c.p. Coordinador de MCIAMB  
c.c.p. Expediente



## **Dedicatoria**

Primeramente, a Dios por darme salud y sabiduría para concluir con esta maestría.

A mis padres Vicenta y Gregorio por ser el motor de mi vida. A mi hermano Obed por ser un apoyo como siempre.

Y por último, pero no menos importante, a mi ayuda idónea, mi gran apoyo incondicional y el amor de mi vida, mi esposo Gerardo.

Esto es por ellos y para ellos.

## **Agradecimientos**

Al CONACYT por su apoyo de la beca recibida durante mi formación profesional a través del programa Maestría en Ciencias en Ingeniería Ambiental con registro en PNPC como posgrado de calidad.

Al Tecnológico Nacional de México / Instituto Tecnológico de Boca del Río, en especial al laboratorio de Investigación de recursos acuáticos (LIRA) por la formación dentro de sus instalaciones y por el apoyo al proyecto de investigación: Efecto de la temperatura de operación de un biorreactor airlift en la degradación de hexadecano por un consorcio microbiano hidrocarbonoclasta.

Al Laboratorio Nacional CIACYT de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí por su apoyo en la investigación del proyecto.

A mi comité académico. La Dra. María del Refugio Castañeda Chávez por su apoyo y paciencia. Al Dr. Manuel Alejandro Lizardi Jiménez por su disciplina y sus retos. A la Dra. Fabiola Lango Reynoso por su asesoramiento. Al Maestro Christian Reyes Velázquez por su ayuda y confianza.

A mis compañeros y amigos del posgrado: Ángel, Alpha, Marguerite, Horacio, Miguel y Aldo, por su amistad y apoyo en esta meta que realizamos juntos.

# Contenido

Dedicatoria .....	2
Agradecimientos.....	3
Índice de Figuras.....	6
Índice de Tablas.....	7
Nomenclatura .....	8
Abstract .....	9
Resumen.....	10
1. Introducción.....	11
2. Antecedentes .....	13
2.2 Técnicas de Remediación .....	14
2.2 La biorremediación .....	15
2.3 Consorcio microbiano.....	17
2.4 Biorreactores.....	18
2.5 Biorreactor Airlift.....	20
2.6 Parámetros fisicoquímicos que influyen en la degradación de hidrocarburos en un biorreactor.....	22
2.7 Variación en la temperatura de operación.....	23
3. Justificación.....	24
4. Pregunta de Investigación.....	25
5. Hipótesis .....	25
6. Objetivos .....	25
6.1 Objetivo General .....	25
6.2 Objetivo Particulares .....	25
7. Materiales y Métodos .....	26
7.1 Área de trabajo.....	28
7.2 Acondicionamiento del reactor biológico. ....	28
<b>7.2.1 Revisión bibliográfica .....</b>	<b>28</b>
<b>7.2.2 Evaluación del diseño del reactor .....</b>	<b>28</b>
<b>7.2.3 Consorcio Microbiano .....</b>	<b>29</b>
<b>7.2.4 Medio de cultivo .....</b>	<b>30</b>
<b>7.2.5 Inoculación .....</b>	<b>30</b>

7.2.6	<b>Operación del reactor a diferentes temperaturas .....</b>	<b>30</b>
7.2	Fase de evaluación hidrodinámica y cinéticas. ....	31
7.3.1	<b>Toma de muestra.....</b>	<b>31</b>
7.3.2	<b>Técnicas y análisis de los parámetros fisicoquímicos del BAL.....</b>	<b>31</b>
7.2.3	<b>Técnicas y análisis para las cinéticas de crecimiento e hidrocarburo residual</b>	<b>33</b>
7.2.4	<b>Análisis Estadístico .....</b>	<b>34</b>
7.2.5	<b>Modelo Matemático .....</b>	<b>35</b>
8.	Resultados y Discusión .....	36
8.1	Fase de Acondicionamiento del biorreactor Airlift .....	36
8.1.1	<b>Revisión Bibliográfica.....</b>	<b>36</b>
8.1.2	<b>Evaluación y Diseño del biorreactor airlift .....</b>	<b>36</b>
8.1.3	<b>Característica del consorcio microbiano.....</b>	<b>37</b>
8.1.4	<b>Inoculación .....</b>	<b>37</b>
8.1.5	<b>Operación del reactor a diferentes temperaturas.....</b>	<b>38</b>
8.2	Fase de Evaluación hidrodinámica y cinéticas. ....	40
8.2.1	<b>Técnicas y análisis para la evaluación hidrodinámica del BAL. ....</b>	<b>40</b>
	<b>Tensión superficial, viscosidad y oxígeno disuelto .....</b>	<b>42</b>
8.2.2	<b>Evaluación de los parámetros hidrocarbonoclastas. Cinética microbiana e hidrocarburo residual.....</b>	<b>46</b>
9.	Conclusiones.....	54
	Bibliografía .....	57

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Diseño de un Biorreactor Airlift.....	21
<b>Figura 2.</b> Síntesis de la Fase 1 de la estrategia experimental .....	26
<b>Figura 3.</b> Síntesis de la fase 2 de la estrategia experimental.....	27
<b>Figura 4.</b> Diseño del modelo de biorreactor Airlift que se usará en la investigación. ....	29
<b>Figura 5.</b> Biorreactor Airlift utilizado .....	37
<b>Figura 6.</b> Biorreactor airlift a temperatura ambiente (26°C).....	38
<b>Figura 7.</b> Biorreactor Airlift trabajado a temperatura 19°C.....	39
<b>Figura 8.</b> Parámetros analizados a la temperatura de 26°C .....	41
<b>Figura 9.</b> Parámetros analizados a la temperatura 19°C con sus respectivos errores estándar .....	41
<b>Figura 10.</b> Resultados obtenidos de la tensión superficial a las temperaturas de 26°C y 19°C con sus respectivos errores estándar. ....	43
<b>Figura 11.</b> Resultados obtenidos del análisis de viscosidad a las temperaturas de 19°C y 26°C, con sus respectivos errores estándar. ....	44
<b>Figura 12.</b> Porcentaje del Oxígeno disuelto a las dos temperaturas registradas. Se realizó por triplicado, con sus respectivos errores estándar. ....	45
<b>Figura 13.</b> Resultados obtenidos al medir el oxígeno disuelto a las dos temperaturas. Con sus respectivos errores estándar. ....	45
<b>Figura 14.</b> Resultados obtenidos para SS, hidrocarburo residual total y actividad emulsificante a 26°C. Las barras de error indican que todos los análisis se realizaron por triplicado. En la ordenada de la izquierda se indica el crecimiento microbiano y el consumo .....	49
<b>Figura 15.</b> Resultados obtenidos para SS, hidrocarburo residual total y actividad emulsificante a 19°C. Las barras de error indican que todos los análisis se realizaron por triplicado. En la ordenada de la izquierda se indica el crecimiento microbiano y el consumo .....	52



## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Técnicas de remediación (Volke y Velazco, 2002).....	14
<b>Tabla 2.</b> Dimensiones del BAL utilizado.....	37
<b>Tabla 3.</b> Resultados del análisis estadístico ANOVA de los parámetros medidos .....	45
<b>Tabla 4.</b> Valores de R2 del ajuste de modelos matemáticos a los datos experimentales durante el periodo de trabajo usando hexadecano como fuente de carbono en medio mineral a la temperatura de 26°C.....	46
<b>Tabla 5.</b> Parámetros obtenidos del ajuste de los modelos matemáticos durante el periodo de trabajo usando hexadecano como fuente de carbono en el ALB a 26°C. ....	49
<b>Tabla 6.</b> Valores de R2 del ajuste de modelos matemáticos a los datos experimentales durante el periodo de trabajo usando hexadecano como fuente de carbono en medio mineral a la temperatura de 19°C.....	50
<b>Tabla 7.</b> Parámetros obtenidos del ajuste de los modelos matemáticos durante el periodo de trabajo usando hexadecano como fuente de carbono en el ALB a 19°C. ....	53

## Nomenclatura

**AE:** Actividad emulsificante.

**ALB:** Biorreactor Airlift

**D:** Diámetro

**HXD:** Hexadecano

**ln:** Logaritmo natural

**KOH:** Hidróxido de potasio

**NaCl:** Cloruro de sodio

**NaNO<sub>3</sub>:** Nitrato de sodio

**NO<sub>3</sub>:** Nitrato

**pH:** Potencial de Hidrógeno

**SO<sub>4</sub>:** Sulfato

**SS:** solidos suspendidos

**R<sup>2</sup>:** Coeficiente de determinación

**t<sub>i</sub>:** Tiempo de inflexión

**λ:** Fase lag

**μ<sub>max</sub>:** Tasa específica de crecimiento máxima

## Abstract

The present work focuses on knowing the behavior of a hydrocarbonoclast microbial consortium, which was extracted from a cenote in Quintana Roo, by varying the operating temperature in an airlift biorreactor. The main objective of this research was to determine what was the effect of the variation of the operating temperature on the degradation of hexadecane in an airlift bioreactor. The operating temperatures selected to carry out the research were two: at 19 ° C to find out how the consortium worked at a lower temperature than that used in other trials and at 26 ° C as the high temperature. Various physicochemical parameters such as pH, density, viscosity, surface tension were measured, and the kinetics in suspended solids, residual hydrocarbon and emulsifying activity were also evaluated.

It was evaluated that in the physicochemical parameters there is no significant variation in the measured temperatures, showing that the consortium manages to behave similarly in warm and temperate environments. Regarding the kinetics, in solids suspended at a temperature of 26 ° C it increased from 1.1 g L<sup>-1</sup> to 3.2 g L<sup>-1</sup> and it was possible to consume the hexadecane in 11 days. By varying the temperature at 19 ° C, the suspended solids increased from 1.07 g L<sup>-1</sup> to 3.02 g L<sup>-1</sup> and the hydrocarbon was consumed only 83% at the end.

This shows us that, although the consortium behaves similarly at both temperatures, its hydrocarbonoclast efficiency improves at a temperature of 26 ° C, probably due to the low presence of biosurfactants, since it is shown that at a temperature of 19 ° C the biosurfactants had a much higher level in kinetics, which can influence the degradation of hexadecane.

## Resumen

El presente trabajo se enfoca en conocer el comportamiento de un consorcio microbiano hidrocarbonoclasta, el cual fue extraído de un cenote de Quintana Roo, al variar la temperatura de operación en un biorreactor airlift. El objetivo principal de esta investigación fue determinar cuál era el efecto de la variación de la temperatura de operación en la degradación del hexadecano en un biorreactor airlift. Las temperaturas de operación seleccionadas para realizar la investigación fueron dos: a 19°C para conocer como el consorcio trabajaba a una temperatura menor a la que se había trabajado en otros ensayos y a 26°C como la temperatura alta. Se midieron diversos parámetros fisicoquímicos como el pH, la densidad, la viscosidad, la tensión superficial, y también se evaluó la cinética en los sólidos suspendidos, el hidrocarburo residual y la actividad emulsificante.

Se evaluó que en los parámetros físicoquímicos no existe una variación significativa en las temperaturas medidas, demostrando que el consorcio logra comportarse similar en ambientes templados y cálidos. En cuanto a las cinéticas, en sólidos suspendidos a una temperatura de 26°C se incrementó de 1.1 g L<sup>-1</sup> a 3.2 g L<sup>-1</sup> y se logró consumir el hexadecano en 11 días. Al variar la temperatura a 19°C los sólidos suspendidos se incrementaron de 1.07 g L<sup>-1</sup> a 3.02 g L<sup>-1</sup> y el hidrocarburo se consumió solo al 83% al final.

Esto nos demuestra que, aunque el consorcio se comporta similar en ambas temperaturas, su eficiencia hidrocarbonoclasta mejora a una temperatura de 26°C, probablemente por la poca presencia de biosurfactantes, ya que se muestra que a una temperatura de 19°C los biosurfactantes tuvieron un nivel mucho mayor en la cinética, lo cual, puede causar una influencia en la degradación del hexadecano.

# 1. Introducción

En la actualidad, la gran cantidad de contaminantes producidos por las actividades antropogénicas han provocado en los últimos años un desgaste en los recursos naturales que el medio ambiente nos ofrece. La contaminación de ambientes marinos y acuáticos es de mucho interés, siendo los hidrocarburos uno de los mayores contaminantes de esta zona en general. La sociedad científica en su totalidad se ha enfocado en crear y desarrollar mejoramientos en el tratamiento de aguas, suelos y parte de este desarrollo es la biorremediación. La biorremediación es un método que ayuda a mitigar o disminuir el impacto causado por la presencia de contaminantes con la ayuda de organismos que tengan la habilidad de degradarlos a diferentes condiciones ambientales y de operación como lo es la temperatura, pH, salinidad y concentración de nutrientes.

En México se han realizado estudios de biorremediación con consorcios microbianos hidrocarbonoclastas, los cuales son un conjunto de dos o más poblaciones microbianas capaces de degradar hidrocarburos, y que se han presentado sobre todo en la zona de la Riviera Maya, específicamente en los cenotes de la región de Quintana Roo donde se han tenido registro de contaminación por hidrocarburos en sus ambientes acuáticos. Los estudios se han realizado debido a que esta contaminación presente en los acuíferos de la zona es una problemática por tratar, ya que los cenotes son los que proveen casi la totalidad de agua dulce en la región, pues carecen de aguas superficiales. En los estudios realizados se han obtenido consorcios microbianos de algunos cenotes de Quintana Roo contaminados por hidrocarburos. Estos consorcios nativos de los cenotes fueron estudiados en reactores biológicos o biorreactores de diferente tipo, analizando su cinética y la degradación de los hidrocarburos que se encontraran en la zona.

Las condiciones de operación en los biorreactores evalúan diferentes variables dentro del sistema como lo es el desempeño en la capacidad hidrocarbonoclasta de un consorcio microbiano, siendo la temperatura uno de los esenciales y la cual este trabajo se enfoca.

En el presente documento se aborda la evaluación experimental del efecto de la temperatura en los factores fisicoquímicos y el crecimiento microbiano que influyen en la

degradación del hidrocarburo, en este caso el hexadecano en medio líquido, en un biorreactor airlift. La temperatura no suele variar en la operación, así que no se tiene un registro en el cual podamos comprobar si existe o no una mejora al variar este parámetro fundamental para la biodegradación en un biorreactor y conocer si la degradación de hidrocarburos tenga una mayor eficiencia al trabajar con una temperatura diferente a la usual.

Esta investigación aporta un enriquecimiento al abordar y discutir cómo la temperatura puede influir en poco o gran manera un proceso de biorremediación con un consorcio microbiano y así conocer como el sistema del biorreactor tendría un mejor funcionamiento para degradar.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Contaminación de cuerpos acuáticos por hidrocarburos en México

La contaminación con hidrocarburos es uno de los temas intensamente investigado debido al impacto ambiental, lo constante que suele ser en toda la región del Golfo y Pacífico y la importancia económica de la industria petroquímica en el país (Saval, 2000). Una de las fuentes de contaminación en los cuerpos de agua son el proceso de refinado del petróleo crudo, siendo las refinerías las que generan una gran cantidad de aguas residuales, que, dado por la magnitud, son difíciles de tratar. (Xianling *et al.*, 2005).

Los impactos directos sobre el medio ambiente están relacionados con la muerte y la pérdida de especies dentro de un ecosistema (ITOPF, 2017). Los hidrocarburos se adhieren a las branquias de los peces, afectando su respiración y además afectan a las algas y el fitoplancton lo cual, hace una baja en la alimentación y reproducción de la vida acuática en general (Reeves, 2005); otros compuestos derivados de los combustibles y petróleo también se encuentran presentes en los moluscos bivalvos y algunos tipos de crustáceos (Botello, 2005). En el caso de los HAP son altamente liposolubles y por ello son absorbidos rápidamente por el tracto intestinal de los mamíferos (Samanta *et al.*, 2002)

Dentro del ámbito sanitario, cuando nos referimos a la población que vive en los alrededores de ríos, lagos o sitios contaminados por hidrocarburos, la población presenta diferentes padecimientos, desde los niños que tienden a desarrollar problemas pulmonares (Salvi, 2007) hasta adultos que están expuestos a los daños debido a su trabajo (pescadores) lo cual les genera cáncer en distintos órganos (Boffetta *et al.*, 1997) entre otros problemas de salud. El impacto de los hidrocarburos puede permanecer durante décadas, con lo cual el riesgo de exposición se mantiene vigente (Olguin, 2009).

Los hidrocarburos presentes en agua son oxidados y mineralizados mediante procesos de remediación con consorcios microbianos hidrocarbonoclastas, generando un gran interés industrial y de investigación por el desarrollo de tecnologías capaces de recuperar agua contaminada (Lizardi-Jiménez, 2011).

## 2.2 Técnicas de Remediación

Uno de los rasgos característicos de la sociedad en la actualidad es la gran cantidad de emisión de contaminantes químicos hacia los cuerpos de agua y suelos del medio ambiente. Debido a esto, se han creado estrategias para minimizar la contaminación, disminuyendo la reactividad y peligrosidad de los contaminantes y de forma simultánea, reducir el vertimiento al medio ambiente. En la actualidad la tecnología y la ciencia nos ofrece una gama de posibilidades que permitan restaurar el daño ocasionado a los ecosistemas acuáticos. En este contexto se debe desarrollar técnicas de remediación como alternativas para la recuperación de ecosistemas y agroecosistemas impactados (Adams, Domínguez y García, 1999). Las técnicas de remediación pueden clasificarse de diferentes maneras, con base a los siguientes principios: estrategia de remediación, lugar en que se realiza el proceso de remediación, y tipo de tratamiento (Volke y Velasco, 2002). A continuación, se describen con más detalle las clasificaciones anteriores:

<b><i>Estrategias de remediación</i></b>	Destrucción de los contaminantes Extracción o separación Asilamiento del contaminante
<b><i>Lugar de realización del tratamiento de remediación</i></b>	In situ Ex situ
<b><i>Tipo de tratamiento</i></b>	Biológico Fisicoquímico Térmico

**Tabla 1.** Técnicas de remediación (Volke y Velasco, 2002)



Las técnicas de remediación fisicoquímicas son de costo moderado, accesibles y con un corto periodo en cada tratamiento. Se basa principalmente en las propiedades de los contaminantes para destruir, separar o contener alguna afectación (Sellers, 1999). Las técnicas de remediación fisicoquímicas se pueden dividir en físicas y químicas como la aspersión de aire, dispersión del terreno, lavado de suelos, incineración, entre otros (Summersgill, 2006).

Las técnicas de remediación térmicas tienen tiempos muy rápidos de limpieza y se fundamentan en la implementación de temperatura para incrementar la separación/volatilidad, quemado y descomposición o la fundición de los contaminantes. (EPA/540/S-97/505). La mayoría de estos tratamientos solo transfieren los contaminantes de un lugar otro, en lugar de eliminarlos del todo. (Lizardi-Jiménez, *et al.*, 2016)

## **2.2 La biorremediación**

La biorremediación es una opción que ofrece la posibilidad de destruir diversos contaminantes mediante la actividad biológica. Utiliza técnicas de bajo costo y baja tecnología, teniendo una alta aceptación pública y a menudo se puede llevar a cabo en el sitio contaminado (Vivaldi, 2009) pero también se pueden efectuar en reactores biológicos fuera del ambiente donde existe la contaminación y lograr una eficiencia esperada (Hernández, *et al.*, 2018).

El término biorremediación, el cual fue establecido a principios de la década de los '80, proviene del concepto de remediación, correspondiendo a la aplicación de estrategias fisicoquímicas para evitar el daño y contaminación del ambiente (Di Paola, 2010). Su objetivo es minimizar lo más que se pueda las consecuencias que un derrame pudiera ocasionar. Este proceso es llevado a cabo por microorganismos o consorcios microbianos nativos de la zona de impacto o por microorganismos adicionados. Ambos procesos consiguen una biotransformación de sustancias peligrosas en sustancias menos tóxicas o inocuas. La selección de una determinada tecnología de biorremediación está condicionada

por múltiples factores, como, por ejemplo, el tipo de microorganismos presentes en el medio, las condiciones del compartimiento contaminado (temperatura, oxígeno, energía, etc.), la concentración y la toxicidad de los contaminantes entre otros (Van Hamme *et al.*, 2003). La biorremediación es una técnica que son rentables y son ambientalmente sostenibles (Fuentes *et al.*, 2014).

Existen varios procedimientos en la biorremediación:

**Fitorremediación:** Este proceso se basa en el uso de plantas para limpiar ambientes contaminados y constituye una estrategia muy interesante, debido a la capacidad que tienen algunas especies vegetales de absorber, acumular y/o tolerar altas concentraciones de contaminantes como metales pesados, compuestos orgánicos y radioactivos, etc. Las ventajas que ofrece la fitorremediación son el bajo costo y la rapidez con que se puede llevar a cabo algunos procesos que ayuden a degradar los contaminantes (Di Paola, 2010).

**Degradación enzimática:** Este tipo de degradación consiste en el empleo de enzimas en el sitio contaminado con el fin de degradar las sustancias nocivas. Estas enzimas se obtienen en cantidades industriales a partir de bacterias que las producen naturalmente, o por bacterias modificadas genéticamente que son comercializadas por las empresas biotecnológicas. La degradación se logra gracias a la capacidad natural de los organismos antes mencionados de transformar moléculas orgánicas en sustancias más pequeñas, que resultan menos tóxicas (Salleh *et al.*, 2003)

**Remediación microbiana:** Se refiere al uso de microorganismos directamente en el foco de la contaminación. Estos microorganismos pueden existir en ese sitio o provenir de otros ecosistemas, en cuyo caso deben ser inoculados en el sitio contaminado. Cuando no es necesaria la inoculación de microorganismos, suelen administrarse nutrientes, como nitrógeno, con el fin de acelerar el proceso de degradación. Hay bacterias y hongos que pueden degradar con relativa facilidad petróleo y sus derivados, benceno, tolueno, hidrocarburos de cadena larga, pesticidas, entre otros. Los metales pesados no son biodegradables pero las bacterias pueden concentrarlos de tal manera de aislarlos para que sean eliminados más fácilmente (Di Paola, 2010).

La biodegradación de hidrocarburos es un proceso complejo, ya que depende de la concentración y la naturaleza de éstos en el ambiente (Das y Chandran, 2011). En diferentes investigaciones y trabajos se ha demostrado que es más factible trabajar con consorcios microbianos que con cepas puras ya que existe un mejor rendimiento en la degradación de hidrocarburos y es una alternativa con más ventaja para remediación del ambiente contaminado (Lizardi – Jiménez *et al.*, 2014).

### **2.3 Consorcio microbiano**

Un consorcio microbiano es una asociación natural de dos o más poblaciones microbianas, de diferentes especies, que actúan conjuntamente como una comunidad en un sistema complejo, donde todos se benefician de las actividades de los demás. La asociación refleja estilos de vida sinérgicos o sin tróficos en el que el crecimiento y el flujo de nutrientes se conduce de manera más efectiva y eficiente que en poblaciones puras (López, 2007). Como se comentó anteriormente, la biodegradación de hidrocarburos requiere la cooperación de varias especies bacterianas, con diferentes capacidades metabólicas, dado que el uso de consorcios microbianos produce un aumento en la tasa de consumo de los hidrocarburos (Ghazali, 2004).

Los consorcios microbianos hidrocarbonoclastas han sido identificados y, algunos aislados directamente de sedimentos, suelos o cuerpos de agua contaminados con petróleo o derivados de este. Particularmente algunas cepas de estos consorcios encontrados tienen cierta capacidad especial para degradar hidrocarburos como el hexadecano (HXD). El HXD es un sustrato de baja solubilidad en agua ( $\sim 10^{-7}$  mg L<sup>-1</sup>) que puede presentarse en formas libres como gotas macroscópicas y soluble y/o en formas emulsificadas (microgotas) (Mehrnia *et al.*, 2005), siendo que se encuentre en presencia de agentes surfactantes, con lo que aumenta su concentración en la fase acuosa y con esto su biodisponibilidad (Quijano *et al.*, 2010). Una vez siendo biodisponible, el HXD es una fuente de carbono y energía para muchos microorganismos tanto en cepas puras (Pepi *et al.*, 2005) como en cultivos mixtos como los consorcios microbianos (Medina-Moreno *et al.*, 2005). La biodegradación de este tipo de hidrocarburos como el HXD, en medio líquidos se requiere la participación de varias

especies bacterianas, teniendo capacidades metabólicas distintas para una mejor degradación. Se ha demostrado que al usar consorcios microbianos aumenta la tasa de consumo de hidrocarburos con respecto a las tasas de consumo de cepas puras (Ghazali *et al.*, 2004). En los consorcios existirán cepas que tengan el genotipo para degradar hidrocarburos y otras tengan la capacidad de producir biosurfactantes (Saravanan *et al.*, 2009). El uso de consorcios microbianos en reactores biológicos puede ser una alternativa eficiente en la degradación de hidrocarburos, siendo una ventaja sobre las técnicas de biorremediación mencionadas. (Hernández *et al.*, 2018).

## **2.4 Biorreactores**

Un Biorreactor es un equipo donde se realiza el proceso de cultivo (también comúnmente denominado “fermentador”), sea en estado sólido o líquido. Su diseño debe ser tal que asegure homogeneidad entre los componentes del sistema y condiciones óptimas para el crecimiento microbiano y la obtención del producto deseado. En algunos casos, es un recipiente en el que se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos (Doble, Kumar y Gajanan, 2004).

Los biorreactores se emplean en la manufactura de productos comerciales como metabolitos primarios (alcoholes, ácidos orgánicos, aminoácidos, etc.) y metabolitos secundarios (antibióticos); enzimas industriales, cultivos de células y tratamientos de agua residuales (López-Gómez 2007).

Los biorreactores con condiciones homogéneas, debido a su agitación constante, se pueden dividir dependiendo de su modo de operación en tres diferentes tipos: Biorreactores discontinuos los cuales son sencillos de operar e industrialmente se utilizan cuando se han de tratar pequeñas cantidades de sustancias. No tienen entrada o salida de nutrientes y biomasa. Normalmente son implementados para la puesta en marcha, crecimiento y desmontaje. Los biorreactores continuos son ideales para fines industriales cuando han de tratarse grandes cantidades de sustancia y permiten obtener un buen control de la calidad del producto. Tienen un flujo uniforme de entrada y salida de nutrientes, donde la

alimentación debe ser consistente con la cantidad de nutrientes que son usados y a la vez extraídos del biorreactor. Estos sistemas no tienen sedimentación. Y los biorreactores semicontinuos, sistemas más flexibles, pero de más difícil análisis y operación que los anteriores; estos consisten en remover al “final” de la operación un 80 o 90% de la producción de biomasa y es restituida con una cantidad equivalente de medio de cultivo. Este proceso permite un “reinicio” con un inóculo de gran tamaño y elimina la fase de adaptación del microorganismo al medio, lo que favorece la velocidad de crecimiento, la cual puede controlarse con estrategias de suministro de nutrientes (López, *et al.*, 2009).

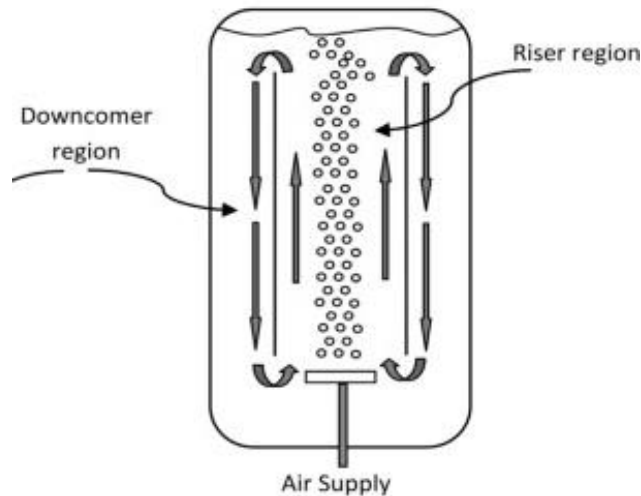
Los biorreactores son clasificados según su configuración y diseño, entre ellos se pueden encontrar: el biorreactor tubular siendo su fabricación con plástico o cristal, en forma tubular ya sea horizontal, vertical, serpentín o cónico; normalmente estos operan al aire libre debido a la escala de trabajo y por tanto requerimiento de espacio. La transferencia de O<sub>2</sub> o CO<sub>2</sub> se suele hacer a partir de la inyección de aire, la cual también permite su agitación. El biorreactor tipo panel tiene una gran relación superficie: volumen, esto favorece el área superficial y así la captación de luz, por esta razón este tipo de sistema es especialmente utilizado para organismos fotoautótrofos (Ruiz, *et al.*, 2007). El Fotobiorreactor (FBR) es un biorreactor que incorpora algún tipo de fuente de luz. Los FBRs son por lo tanto sistemas especializados para el cultivo de microorganismos fotoautótrofos. Son principalmente empleados en el cultivo de microalgas, los FBRs introducen CO<sub>2</sub> para mejorar el crecimiento en presencia de luz, agua y nutrientes (Merchuk, *et al.*, 2003). El biorreactor airlift consiste en un sistema de agitación neumática constituido por una columna dentro del contenedor, que facilita el intercambio de materia gas-líquido por medio de la entrada inferior de CO<sub>2</sub> a través de una cavidad (Vunjak-novakovic *et al.*, 2005). Con el transcurso del tiempo se han diseñado diferentes tipos de reactores como el tanque agitado tanto mecánica como neumáticamente, los reactores de lecho fijo y fluidizado y los que combinan ambos tipos de diseños como los reactores airlift (Chisti y Jáuregui-Hazza, 2002).

## 2.5 Biorreactor Airlift

En la actualidad el biorreactor airlift (BAL) ha recibido una mayor atención por parte de la industria química y biotecnológica, ya que muestran ciertas ventajas como una construcción simple y bajo consumo de energía, aunado a una elevada proporción de transferencia de masa, momento y calor (Jin *et al.*, 2001).

Los biorreactores airlift son dispositivos de contacto gas-líquido de importancia creciente en la industria biotecnológica y de manera general consisten en un recipiente de líquido dividido verticalmente en dos zonas conectadas en la parte superior e inferior. En unas de estas zonas (riser) se inyecta aire, en la otra se produce el descenso de líquido de la zona no aireada, estableciéndose una circulación axial. La retención del gas en la zona aireada, origina una diferencia en la densidad de la mezcla gas-líquido, lo que induce justamente la circulación del fluido dentro del reactor (Chisti *et al.*, 1988). En la figura 1 se aprecia como esta estructurado generalmente un BAL más específicamente, el cual consta de 3 regiones como se mencionaba anteriormente: zona de ascenso de aire, zona de descenso y zona de rompimiento. Las burbujas son rociadas dentro de la zona de ascenso de aire, la cual puede encontrarse dentro o fuera del tubo difusor. Las burbujas en la zona de ascenso de aire causan que el líquido fluya verticalmente. Para contrarrestar estas fuerzas ascendentes, el líquido fluye hacia abajo en la zona de descenso. Esto lleva a una circulación de líquido y mejores eficiencias de mezclado que en las columnas de burbujeo (Mahmood K.H. AL-Mashhadani *et al.*, 2015)

La circulación mejorada de líquido también causa que las burbujas se muevan en una dirección uniforme a una velocidad relativamente uniforme. Ese patrón del flujo de las burbujas reduce la coalescencia de burbujas, resultando en valores mayores de  $K_La$  (el coeficiente volumétrico de masa) que en reactores de columna de burbujeo (Stanbury, Hall, *et al.*, 2017).



**Figura 1.** Diagrama esquemático de un biorreactor airlift. (Mahmood K.H. AL-Mashhadani et. al., 2015)

El gas es separado del líquido en los BAL que tienen un bucle externo y una conexión horizontal entre el área de ascenso y de descenso en la parte superior de la columna. Usualmente, las células que crecen en un BAL tienen mayores productividades que aquellas que crecen en tanques agitados. La zona de desconexión puede agregar volumen al reactor, reduciendo la formación de espuma para minimizar la recirculación de burbujas a través de la zona de descenso. El ensanchamiento repentino en la parte superior del reactor reduce la velocidad de las burbujas y, por lo tanto, las separa del flujo de líquido. Esto evita que entren burbujas ricas en CO<sub>2</sub>. La velocidad reducida de las burbujas en la zona de desacoplamiento también conduce a una reducción de la pérdida de medio debido a la formación de aerosoles (Stanbury, Hall, et al., 2017).

## **2.6 Parámetros fisicoquímicos que influyen en la degradación de hidrocarburos en un biorreactor**

En la mayoría de los estudios donde se trabajan con biorreactores se registran la evaluación de las diferentes variables de operación o parámetros fisicoquímicos como son: la viscosidad, la densidad, su tensión superficial, el tiempo de mezclado, entre otras, los cuales influyen en la eficiencia de los procesos que se llevan durante la operación (Pérez y Torres, 2008; Giácoman et al., 2006).

La viscosidad y la densidad se han medido como indicadores en algunos trabajos existentes, en un caso particular la viscosidad es medida para comprobar la eficiencia del agitador en un tanque agitado (Naranjo-Gómez, 2014).

La viscosidad, la tensión superficial y la densidad también son parámetros que aportan en conocer mejor la hidrodinámica de un biorreactor, sobre todo para medir el número de Reynolds. En algunos casos se analizan para conocer mejor el mecanismo de absorción de hidrocarburos como el petróleo, el diésel y otros sustratos no miscibles, ya que este mecanismo es fundamental porque está directamente relacionado con la transferencia de masa y la hidrodinámica en los biorreactores y, por lo tanto, es un criterio importante para su operación exitosa (Ángeles, *et al.*, 2017).

La tensión superficial va de la mano con la producción de biosurfactantes, éstos son importantes para identificar qué tipo de consumo de hidrocarburos realiza el consorcio microbiano como se mencionó en el párrafo anterior. Cuando la tensión superficial es medida, se puede relacionar con la cantidad de hidrocarburos degradados, si la tensión superficial es baja significa que los hidrocarburos degradados permiten reducir la interface entre éstos y la solución acuosa, dando lugar a una emulsificación y aumento en la accesibilidad de compuestos insolubles (Jiménez, 2018).

El oxígeno disuelto (OD) también forma parte de los parámetros para conocer mejor el funcionamiento del biorreactor, sobre todo en los sistemas aerobios. En los procesos aerobios de tratamiento de aguas es importante la aeración, debido a la baja solubilidad el



oxígeno. Debido a esto el oxígeno debe ser suministrado continuamente al cultivo si se desea mantener una población activa, este oxígeno debe transferirse desde la fase gas a la fase líquida para que pueda ser utilizado por los microorganismos (Sillas-Moreno, 2012).

## **2.7 Variación en la temperatura de operación**

La temperatura es un parámetro de operación crucial dentro de un estudio de consorcios microbianos en biorreactores. Ya que este factor influye tanto en la operación del biorreactor como en el crecimiento y metabolismo de los microorganismos. Al ser un parámetro importante, se llevó a cabo esta investigación para tener un mejor estudio sobre los efectos que produce al variar la temperatura.

La temperatura se ha mantenido constante en la mayoría de los estudios donde se han manejado BAL para degradar hidrocarburos con un consorcio microbiano ya sea puro o mixto, siendo una temperatura de 28°C y 30°C las más comunes. Las variables que más se han cambiado para observar si existe algún cambio en la operación suele ser en la aeración del BAL (Sillas Moreno, 2012).

Es de extrañarse que al hacer estudios de consorcios microbianos degradadores de hidrocarburos no presenten una variación en su temperatura, ya que los microorganismos tienden a trabajar diferente en distintos ambientes, dependiendo de sus características. Algunos microorganismos como la *Pseudomona* tienden a tener un mejor crecimiento a la temperatura de 28°C, pero también se ha visto ciertas bacterias del mismo grupo que trabajan mejor a una temperatura baja, llegando a crecer a temperaturas de 4°C. Por el contrario, también existen bacterias que a temperaturas altas tienen un mejor metabolismo (Garrity-Brenner *et al.*, 2005).

Los cenotes de Quintana Roo, de donde son extraídos algunos de los consorcios microbianos hidrocarbonoclastas, han llegado a registrar temperaturas mínimas de 20°C y una media de 26°C en el año (Ordoñez *et al.*, 2010). Con este registro de temperaturas nos da pie para determinar las temperaturas para llevar a cabo la investigación para evaluar las variables de operación en el biorreactor y la capacidad del consorcio para degradar el hidrocarburo.

### 3. Justificación

La remediación de cuerpos de agua contaminados por hidrocarburos es de interés en México. Principalmente porque los acuíferos de agua dulce son importantes fuentes de agua potable para las ciudades aledañas, siendo también hábitats de organismos y fauna marina. Sabiendo lo importante que es preservar este tipo de acuíferos, la biorremediación surge como una alternativa viable aceptada a nivel nacional y mundial.

Existen estudios de consorcios microbianos nativos en algunas zonas de Quintana Roo, específicamente en los cenotes, que se han estudiado a detalle y trabajado en biorreactores para la degradación de hidrocarburos que contaminan los mantos acuíferos. En la mayoría de estas investigaciones se centran en la evaluación de los parámetros y variables de operación a una temperatura constante. Los estudios realizados con consorcios microbianos extraídos de cenotes usan temperaturas que están por encima de los 28°C, siendo la temperatura natural de un cenote varía entre los 20 a 26°C y algunas cepas que conforman los consorcios microbianos pueden habitar en ambientes templados/fríos mejorando su capacidad hidrocarbonoclasta. Es necesario realizar estudios acerca del efecto de la variación de temperatura en la operación de un biorreactor en el cual se encuentra cultivado un consorcio microbiano hidrocarbonoclasta, ya que se conoce poco el comportamiento ante esta variable.

Este estudio tiene como finalidad realizar una evaluación de la variación de temperatura en la operación de un BAL, tomando la temperatura de 19°C como la temperatura baja ya que es la temperatura mínima con la que podemos trabajar puesto que el punto de fusión del hexadecano son 18°C y como temperatura alta la de 26°C siendo la temperatura ambiente durante la experimentación. Llevando a cabo este trabajo, se puede llegar a conocer cómo influye en la capacidad del consorcio microbiano para degradar hidrocarburos y tener un mejor conocimiento de la temperatura ideal para la degradación en un BAL.

## **4. Pregunta de Investigación**

¿Cuál es el efecto de la variación de la temperatura de operación durante la degradación de hexadecano y la cinética microbiana de un consorcio hidrocarbonoclasta en un biorreactor airlift (BAL) ?

## **5. Hipótesis**

La variación en la temperatura de operación en un BAL afecta significativamente en el crecimiento microbiano del consorcio y la degradación del hexadecano.

## **6. Objetivos**

### **6.1 Objetivo General**

Determinar el efecto de la variación de la temperatura de operación en la degradación de hexadecano y la cinética microbiana por un consorcio degradador de hidrocarburos en un BAL.

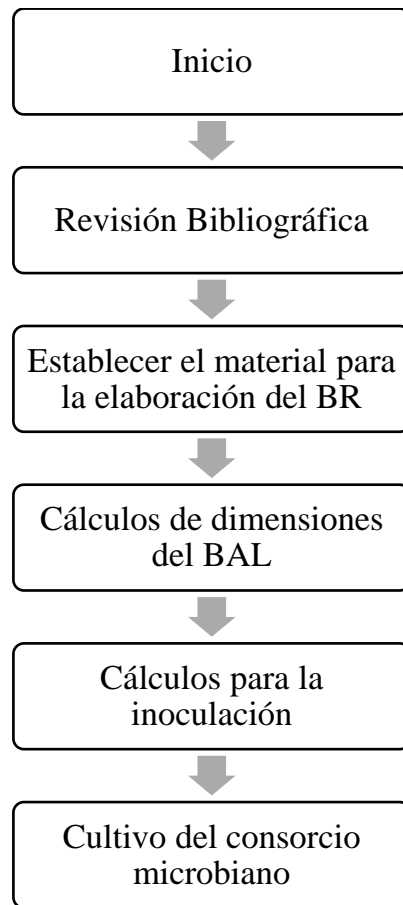
### **6.2 Objetivo Particulares**

1. Establecer las condiciones de operación para el acondicionamiento del BAL.
2. Evaluar la cinética de crecimiento del consorcio microbiano y los parámetros fisicoquímicos de operación por cada lote de BALs a las temperaturas de operación seleccionadas.
3. Evaluar la degradación del hidrocarburo en un BAL por un consorcio microbiano a las temperaturas de operación seleccionadas.

## 7. Materiales y Métodos

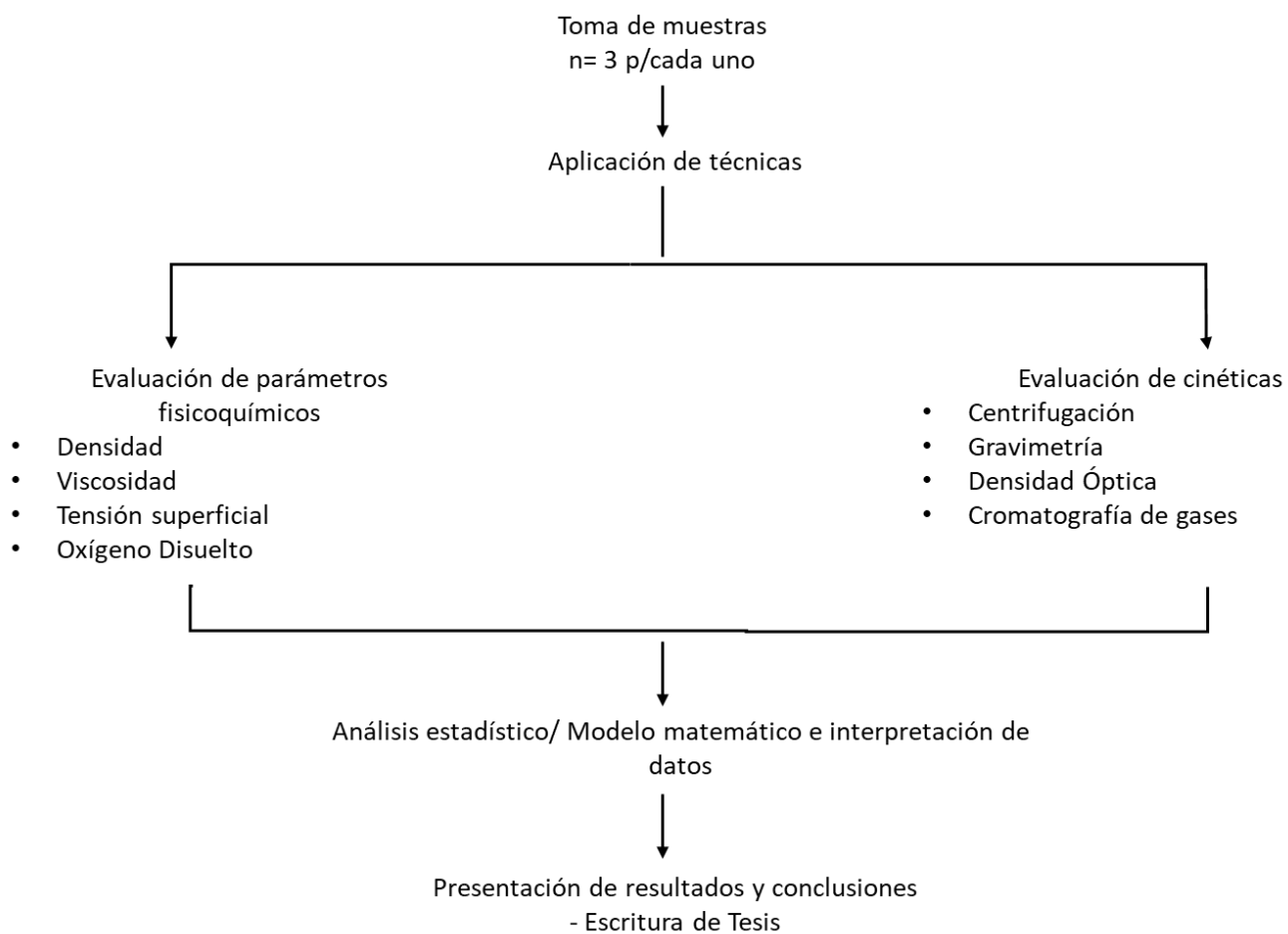
La estrategia experimental se presenta en el esquema 7.1 y 7.2 donde las actividades se clasificaron en dos fases:

Acondicionamiento del biorreactor.



**Figura 2.** Síntesis de la Fase 1 de la estrategia experimental

## Fase de Análisis y Evaluación de cinéticas



**Figura 3.** Síntesis de la fase 2 de la estrategia experimental

## **7.1 Área de trabajo**

El Instituto Tecnológico de Boca del Río es una distinguida comunidad, de enseñanza y aprendizaje, preparando jóvenes profesionistas que se incorporan al sector privado y público. Como parte de su infraestructura de investigación, se encuentra el Laboratorio de Investigación de Recursos Acuáticos (LIRA) que integra a las áreas de Microbiología Acuática, Biología Molecular, Toxicología Acuática, histología, cromatografía y espectrometría, espectrofotometría de adsorción.

LIRA es el área donde se realizó la investigación y se instaló el lote de BALs; se localiza en el municipio de Boca del Río, Veracruz en el Instituto Tecnológico de Boca del Río con las siguientes coordenadas 19° 05' 50"N 96° 06' 28"W. Colinda al norte y al oeste con el Rio Jamapa, al este con el Golfo de México, y al sur con la carretera Veracruz-Córdoba.

## **7.2 Acondicionamiento del reactor biológico.**

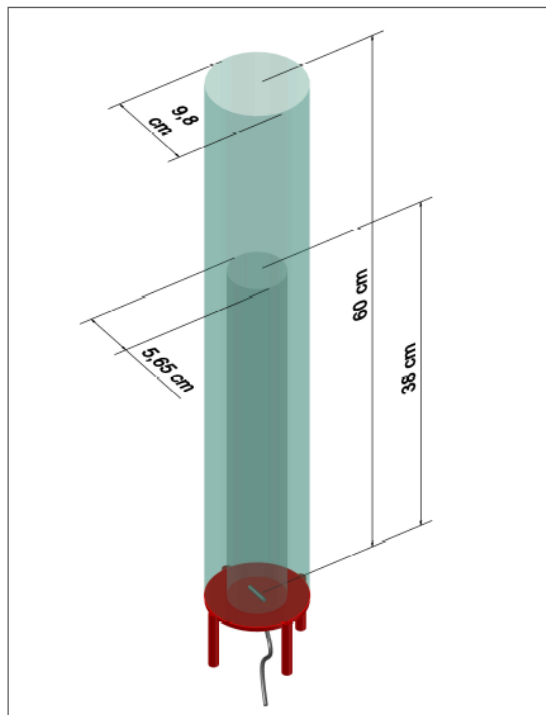
### **7.2.1 Revisión bibliográfica**

Se realizó una búsqueda bibliográfica de las características del BAL, así como los parámetros óptimos que se ocupan para evaluar la degradación de hidrocarburos. La revisión también ayudó a conocer el funcionamiento del biorreactor hidrodinámicamente con el fin de mejorar sus características y optimizarlo.

### **7.2.2 Evaluación del diseño del reactor**

Se propuso un biorreactor tipo Airlift (BAL) junto con el consorcio de Playa del Carmen, Xca-Ha descrito en el siguiente punto para realiza la investigación. La capacidad del BAL será de 3.2 L siendo de material acrílico, seleccionando este material ya que algunos microorganismos pueden degradar ciertos materiales o de igual manera la fuente de carbono puede llegar a reaccionar provocando pérdidas o problemas en los análisis. Se realizó una comparación de las dimensiones de los biorreactores usados anteriormente en la literatura para que exista una mejora en la degradación y el procedimiento sea óptimo.

En la figura 4 se muestra un diagrama de las dimensiones que se escogió para que el biorreactor fuera diseñado. Las dimensiones fueron las siguientes: 60 cm de largo para el tubo externo y 36cm para el tubo interior, de diámetro externo tiene 9.8 cm mientras que el diámetro del tubo interior es de 5.65 cm, en la parte inferior lleva el difusor de aire que va a una salida para conectar la manguera para suministrarlo. El biorreactor va colocado en una base de metal para evitar caídas.



**Figura 4.** Diagrama esquemático de las dimensiones del BAL que se usó en la investigación.

### 7.2.3 Consorcio Microbiano

El consorcio microbiano usado para la investigación es obtenido del punto ubicado en la zona urbana de Playa del Carmen, en el cenote Xca-Ha, cultivado en licor enriquecido con diésel a 37 °C y luego se aisló mediante una placa cruzada. La identificación del cultivo mixto se realizó mediante prueba bioquímica. (Medina-Moreno, 2014)

Los cultivos puros aislados se identificaron como pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Diplococcus*. Otros trabajos encontraron los géneros *Pseudomonas* (Chayabutra y Ju, 2000) y la cultura mixta (Martínez-Trujillo y García-Rivero, 2012; Tanase et al., 2012) trabajando con suelos contaminados con petróleo.

#### **7.2.4 Medio de cultivo**

El consorcio nativo fue cultivado en el medio mineral (Medina-Moreno, Huerta-Ochoa, & Gutiérrez-Rojas, 2005) el cual está constituido por una solución de 6.75, NaNO<sub>3</sub> (J. T. Baker, 100.1%); 2.15, K<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> (Reasol, 99.9%); 1.13, KCl (Alyt, 99.9%) y 0.54, MgSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O (J. T. Baker, 100.0 %) (Medina-Moreno, et al., 2005). El pH fue ajustado a 6.5 con 1.0 M HCl, se adicionan 13 g L<sup>-1</sup> de hexadecano (Sigma–Aldrich, 99.7%) como fuente de carbono y energía. (Lizardi-Jiménez et. al, 2012)

#### **7.2.5 Inoculación**

Se tomaron muestras después de 12 días de adaptación en el medio de cultivo. Se centrifugarán a 4306 xg por 35 minutos y lavados 2 veces con una solución isotónica (0.9% NaCl m/V) para remover el hexadecano residual. Se inoculó el 20% del volumen del reactor como la biomasa inicial, este procedimiento se repetirá para cada ensayo (Brecht et. al., 2017)

#### **7.2.6 Operación del reactor a diferentes temperaturas**

El BAL se operará primeramente en un lote por 12 días a 19°C, siendo la primera variación de temperatura, con HXD como única fuente de carbono siendo inoculado previamente como lo descrito en la sección anterior. Posteriormente, los lotes de BAL se inocularán cada 12 días con biomasa (20% del volumen del reactor) tomada del lote anterior del medio de cultivo con las mismas condiciones de operación establecidas. (Lizardi et al., 2012) Se realizará el mismo procedimiento para los lotes a la temperatura de 26°C.



## **7.2 Fase de evaluación hidrodinámica y cinéticas.**

### **7.3.1 Toma de muestra**

Las muestras fueron tomadas de 10 ml del BAL en los días 0, 1, 2, 3, 5, ,7 ,9, 11 y 12. Éstas fueron recolectadas por medio de una pipeta volumétrica previamente esterilizada y depositadas en tubos falcon de 40 ml.

### **7.3.2 Técnicas y análisis de los parámetros fisicoquímicos del BAL.**

Teniendo en consideración que el consorcio a tratar ha sido poco estudiado tanto microbiológicamente como trabajado en un biorreactor, fue necesario conocer algunos de los parámetros fisicoquímicos de la operación más relevantes, tales como la viscosidad, la densidad, la tensión superficial y medir el oxígeno disuelto en el biorreactor, ya que se tiene poca información sobre éstos. Se planteó el requerimiento de realizar pruebas de laboratorio para determinar a las temperaturas indicadas.

#### **7.3.2.1 Densidad**

Para calcular la densidad, se utilizó un densímetro de vidrio, se sumergió en el mismo biorreactor, apagando la aeración por un momento para que el densímetro no tuviera movimiento y se pudiera tomar una mejor lectura.

Se realizó para ambos biorreactores a sus temperaturas los días en que se tomaban muestras.

#### **7.3.2.2 Viscosidad**

Se tomo 5 ml de muestra para medir la viscosidad con un viscosímetro capilar de Ostwald. Se calibró el viscosímetro con agua a las temperaturas correspondientes y una vez calibrado se calculó el tiempo en que la muestra recorrió los niveles. Teniendo el registro de los tiempos de los dos fluidos se calculó la viscosidad con la siguiente ecuación (eq. 1). Se realizó un triplicado de cada muestra por día.

$$\mu = \frac{\mu_{H2O} \rho_F \tau_F}{\rho_{H2O} \tau_{H2O}} \quad (\text{Eq. 1})$$

Tomando las densidades del fluido y del agua, la viscosidad del agua que ya se tiene registrada y los tiempos de ambos fluidos que se tomaron previamente se puede calcular la viscosidad de la muestra.

### 7.3.2.3 Tensión superficial

Se calculó la tensión superficial tomando muestra de 10 ml de cada biorreactor, usando el método de la barra de equilibrio con la siguiente ecuación (Eq 2).

$$\gamma = \frac{F}{2d} \quad (\text{Eq. 2})$$

Donde:

F es la fuerza que se calcula en Newtons.

d es el largo del dispositivo para medir, en metros.

### 7.3.2.4 Oxígeno Disuelto

El oxígeno disuelto fue medido con una sonda de oxígeno tipo galvánica marca YSI (mod PRO20). Primeramente, se debía calibrarla colocando una solución salina en la membrana y una vez calibrada se sumergía al biorreactor sin desconectar la aeración. Las mediciones fueron solamente los días 0, 6 y 12 para evaluar la variación del oxígeno en las dos temperaturas.

### **7.2.3 Técnicas y análisis para las cinéticas de crecimiento e hidrocarburo residual**

Las muestras se toman los días impares a partir del día 3, como se mencionó en la sección anterior, siendo de 10 ml. Los análisis se hicieron por triplicado y a continuación se describen las técnicas y análisis usados.

#### **7.3.3.1 Centrifugación**

Para centrifugar, se colocan en 3 tubos falcón con muestras del mismo BAL (triplicados) y una solución isotónica (NaCl al 0.9 %) estas muestras son centrifugadas en una centrifuga con enfriamiento modelo Hermle Z323K, durante 45 minutos a 4000 rpm y 4°C (Lizardi, 2011). De este procedimiento se obtienen dos fases una fase precipitada o sólida y una fase líquida acuosa o líquido remanente.

#### **7.3.3.2 Fase sólida**

El precipitado que se obtiene de la centrifugación es lavado en solución isotónica (NaCl 0.9%) siendo analizada por gravimetría (Lizardi-Jiménez et al., 2012) explicándose a continuación.

#### **7.3.3.3 Gravimetría**

Al tener el precipitado lavado con solución isotónica, se colocó en un crisol de porcelana a peso constante y se calentó en un horno de secado a 120°C por 24h. De ahí se tomó el peso final de los crisoles y con las muestras así mismo del peso de la solución isotónica que se usó en el lavado para calcular el peso de los sólidos. (Lizardi – Jiménez et al., 2012)

#### **7.3.3.4 Fase Acuosa**

La fase acuosa resultante de la centrifugación se utilizó para el análisis de actividad emulsificante por densidad óptica y la evaluación de hidrocarburo residual, siendo el procedimiento para cuantificar el hexadecano por medio de cromatografía de gases.

### 7.3.3.5 Actividad Emulsificante

Una vez teniendo el sobrenadante proveniente de la centrifugación. Se mezcló hexadecano con la muestra en una relación 1:5 y se agitaron por medio de un vortex Genie 2-T Scientific 24 industries, durante dos minutos para promover la formación de emulsiones. Posteriormente se dejó reposar durante 24h a temperatura ambiente. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro uv-vis Rayleigh a una longitud de onda de 600 nm, se usó como blanco medio mineral ya que fue como se inoculó en un inicio. (García *et al.*, 2019)

### 7.3.3.6 Hidrocarburo Residual

El hexadecano obtenido de la fase acuosa se medirá por cromatografía de gases (Thermo Scientific) a 300°C con detector de flama ionizante, una columna capilar para detectar Hidrocarburos tr-5 (30 m x 0.25mm, palo alto, USA) y un tanque de gas nitrógeno. Las temperaturas del inyector y del detector serán constantes a 290°C y 300°C, respectivamente. El programa de temperaturas será: 120°C durante 1 min; aumentar en 10°C min<sup>-1</sup> hasta 150°C (2 min); luego por 15°C min<sup>-1</sup> hasta 170°C (1.5 min). El límite de detección para el método de determinación de HXD será de 3 mg L<sup>-1</sup> (Medina Moreno *et al.*, 2014).

## 7.2.4 Análisis Estadístico

Durante las cinéticas se tomaron muestras por triplicado para realizar las diferentes técnicas y así obtener los parámetros hidrodinámicos; los valores graficados corresponden al promedio de las tres lecturas en donde las barras de error representan el error estándar. Para hacer una comparación de los resultados obtenidos se utilizó el programa estadístico (Minitab18) para realizar a cada variable por temperatura un ANOVA y así comparar y determinar, con un 95% de confianza, si eran iguales o diferentes.

### 7.2.5 Modelo Matemático

El modelamiento matemático del crecimiento microbiano se ha utilizado para evaluar parámetros (tasa de crecimiento específica, tiempo de retraso entre otros) requeridos para estudiar el crecimiento bajo diferentes condiciones físicas y químicas (López, et al., 2004).

Se determinaron parámetros cinéticos de los microorganismos ajustando los modelos matemáticos de crecimiento microbiano Gompertz (Eq. 4) y Logístico (Eq. 5) (Valdivia-Rivera, et al., 2019). Las ecuaciones de los modelos son los siguientes:

$$y = a \exp^{-\exp(b-ct)} \quad (\text{Eq. 4})$$

$$y = \frac{a}{[1 + \exp(b-ct)]} \quad (\text{Eq. 5})$$

$$y = \ln\left(\frac{N}{N_0}\right) \quad (\text{Eq. 6})$$

$$\lambda = \frac{b-1}{c} \quad (\text{Eq. 7})$$

$$Ti = \frac{b}{c} \quad (\text{Eq. 8})$$

$$\mu = \frac{ac}{e} \quad (\text{Eq. 9})$$

Siendo  $y$  la variable dependiente, se define como la variación del logaritmo entre la población en un tiempo  $t(N)$  y la población inicial ( $N_0$ ) (Eq.6 ). Con las ecuaciones 3 y 4 que son los modelos matemáticos, se pueden calcular los parámetros que son biológicamente significativos como la tasa máxima de crecimiento, el tiempo de inflexión y la fase lag (Eq 7-9).

## **8. Resultados y Discusión**

### **8.1 Fase de Acondicionamiento del biorreactor Airlift**

#### **8.1.1 Revisión Bibliográfica**

En la revisión bibliográfica se realizó una comparación en las dimensiones, condiciones de operación como el pH, temperatura, aireación. La literatura revisada también nos ayudó a conocer las técnicas y la metodología empleada para evaluar las cinéticas. Se tomó la comparación principalmente de los trabajos realizados por Medina-Moreno et al, 2014 y Lizardi-Jimenez *et al.*, 2016. Dichas investigaciones hicieron uso de biorreactores airlift logrando resultados al trabajar con consorcios microbianos. En el caso de la investigación de Medina-Moreno et al., 2014 trabajaron con el consorcio del cenote Xca-Ha en un biorreactor airlift logrando degradar en su totalidad la fuente de carbono que usaron (diesel) siendo un punto que tomar para este trabajo. En los trabajos de Lizardi-Jiménez donde realiza los procedimientos con BALs utiliza las mismas dimensiones y sus investigaciones fueron de gran utilidad para el diseño del reactor ya que nos basamos en sus medidas, al igual de las técnicas que utiliza para las cinéticas.

#### **8.1.2 Evaluación y Diseño del biorreactor airlift**

Una vez obtenida la información necesaria para evaluar el diseño del reactor con el que se trabajaría. Se eligió el material de acrílico para su elaboración ya que era resistente a las características degenerativas del consorcio microbiano y la fuente de carbono. Se usaron 3 biorreactores con un volumen de 3.2L, en la tabla 2 nos presenta las dimensiones del BAL, el cual mide 60cm de alto x 9.8cm de ancho, un volumen total de 4.53 L y un volumen de operación de 3.2 L. La figura 5 se muestra el resultado final del diseño del biorreactor airlift usado para la investigación.



**Figura 5.** Biorreactor Airlift utilizado

Dimensiones	
De(cm)	9.8
Le(cm)	50
Le + 20%(cm)	60
Di(cm)	5.65
Li(cm)	38
V <sub>op</sub> (L)	3.2
V <sub>total</sub> (L)	3.77
V <sub>total + 20%</sub> (L)	4.53

**Tabla 2.** Dimensiones del BAL utilizado

### 8.1.3 Característica del consorcio microbiano

El consorcio microbiano descrito con anterioridad en el apartado de metodología fue cultivado en los 2 biorreactores, alimentándose con medio mineral y como fuente de carbono el hexadecano. Los resultados obtenidos de la degradación del hidrocarburo se describen con mayor detalle en la fase de cinéticas.

### 8.1.4 Inoculación

Para inocular el consorcio microbiano en los 3 BAL, se le agregaron 13 g L<sup>-1</sup> de la fuente de carbono seleccionada, hexadecano. Se realizó un lote por cada temperatura, por lo que se evaluaron 6 biorreactores, esto con el fin de conocer la variación que puede existir en la degradación con respecto a las condiciones de operación. Para cada parámetro cinético se presentan los siguientes análisis: sólidos suspendidos, hidrocarburo residual y actividad emulsificante. Para los parámetros hidrodinámicos se realizaron: viscosidad, densidad,

tensión superficial y medición del oxígeno disuelto. Se presentan barras de error, evidenciando que cada experimento se realizó por triplicado.

### **8.1.5 Operación del reactor a diferentes temperaturas.**

Los biorreactores airlift operaron a las siguientes temperaturas: 26°C y 19°C . Para la temperatura de 26 °C el biorreactor permaneció en un área donde se mantenía a una temperatura ambiente que variaba entre  $\pm 1^\circ$  de diferencia. Se colocó el biorreactor en una base metálica diseñada especialmente para sostenerlo, contenía un orificio en la parte baja para la salida de la manguera que alimentaba el aire del biorreactor y así no existiera inconvenientes. En la figura 6 se puede mostrar como el biorreactor airlift se encontraba trabajando durante el ciclo del experimento. La base en donde se encontraba era metálica y era sostenido para evitar derrames o caídas.



**Figura 6.** Biorreactor airlift a temperatura ambiente (26°C)



Para la temperatura de 19°C se utilizó un equipo de enfriamiento llamado NeoCooler Circulator CF300. Este equipo junto con un recipiente de un volumen de aproximadamente 15L servía como una chaqueta de enfriamiento al colocar el biorreactor dentro del recipiente con una solución de etanol al 40% para que la temperatura bajara y lográramos mantenerla a 19°C. El biorreactor fue sostenido por un soporte universal y así se mantuvo estable durante todo el procedimiento. El proceso fue repetido por 3 veces, para tener un rango mayor de resultados en las variaciones de los parámetros medidos. La figura 7 muestra como operaba el reactor a la temperatura de 19°C.



**Figura 7.** Biorreactor Airlift trabajado a temperatura 19°C

## **8.2 Fase de Evaluación hidrodinámica y cinéticas.**

### **8.2.1 Técnicas y análisis para la evaluación hidrodinámica del BAL.**

En esta sección se muestra los resultados de los análisis que se realizaron al evaluar los parámetros fisicoquímicos del BAL para conocer su comportamiento al degradar hexadecano a las temperaturas seleccionadas. El análisis fisicoquímico de las propiedades de la fase líquida (densidad, pH, entre otras) son relevantes y juegan un papel importante en los fenómenos de hidrodinámica y transferencia de masa (Gómez-Díaz y Navaza, 2003), que afectan el crecimiento de los consorcios microbianos y finalmente su capacidad de degradar hidrocarburos en un biorreactor. En la figura 8 y 9 se muestran los resultados obtenidos al medir el pH y la densidad, los cuales se realizaron en los mismos días en los que se tomaban las muestras.

Al inicio de la corrida del primer BAL a la temperatura de 26°C con el consorcio inoculado, se realizó un ajuste de pH en cada reactor con un valor de 6.9 para cada temperatura y como se muestra en la figura fue ascendiendo gradualmente hasta registrar un valor de 8.6 para la temperatura de 26°C y de 8.75 para la de 19°C, lo que se interpreta es que la temperatura influye muy poco en el pH del consorcio y sigue siendo un valor óptimo en el que las bacterias pueden realizar la degradación de hidrocarburos, comparando los resultados con los trabajos que se han registrado anteriormente como Medina-Moreno et. al, 2014 donde se trabajó con el mismo consorcio, los valores fueron parecidos, siendo así valores permisibles para que el consorcio funcionara en su totalidad para la degradación del hexadecano.

La densidad fue el único parámetro que se registró diferencias significativas en el modelo estadístico (ANOVA), entre las dos temperaturas, el cual se puede observar en la tabla 3. La densidad es uno de los parámetros fisicoquímicos que se llegan a medir cuando se necesita conocer la hidrodinámica del BAL. En la figura 8 se muestra que a la temperatura de 26° C se mantiene una densidad de 1008 g L<sup>-1</sup> lo contrario a la figura 9 que muestra como la densidad esta de 10015 g L<sup>-1</sup> y tiene días que baja o sube uno a la temperatura de 19°C. Se

puede registrar en el trabajo de Ángeles, et. al, 2017 algunos resultados al medir la densidad con el mismo consorcio. En su trabajo, manejó una ug de 2.4 y una temperatura de 28°C donde registró una densidad de 970 g L<sup>-1</sup>, esto puede indicar que la temperatura si afecta en la densidad, siendo a una menor temperatura una mayor densidad del fluido.



**Figura 8.** Parámetros analizados a la temperatura de 26°C con sus respectivos errores estándar.



**Figura 9.** Parámetros analizados a la temperatura 19°C con sus respectivos errores estándar

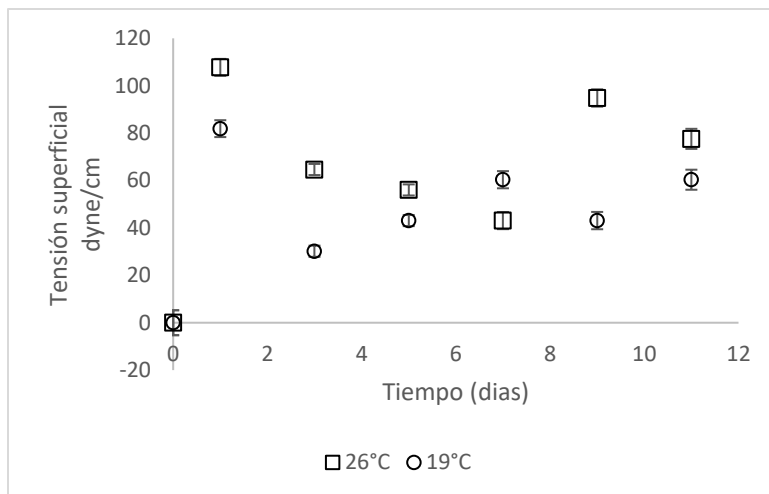
## Tensión superficial, viscosidad y oxígeno disuelto

En esta sección se registró los parámetros de tensión superficial, viscosidad y oxígeno disuelto. La tensión superficial se midió con un tensiómetro digital y realizando los cálculos pertinentes.

En la figura 10 se muestra los valores registrados de la tensión superficial a las dos temperaturas (26°C y 19°C) se puede observar como la tensión superficial disminuyó en el día 3 en ambas temperaturas, pero a partir de ahí tienen un comportamiento diferente. En la temperatura de 19°C volvió a aumentar un poco en los días 5 y 7 y para el día 9 disminuyó nuevamente para terminar en 60.34 dinas  $\text{cm}^{-1}$ . Para la temperatura de 26°C disminuyó aún más en los días 5 y 7 pero al día 9 se elevó su valor nuevamente para terminar en el día con 77.58 dinas  $\text{cm}^{-1}$ . En los trabajos registrados por Jiménez *et al.*, 2018, realizaron análisis de un consorcio hidrocarbonoclasta, tomando en cuenta la tensión superficial. En este trabajo en específico, la tensión superficial bajaba gradualmente debido a la presencia de biosurfactantes, mismos que se pueden relacionar con la cantidad de hidrocarburos degradados permitiendo reducir la interface entre los hidrocarburos y la solución acuosa dando lugar a una emulsificación y aumento en la accesibilidad de compuestos insolubles. Para el consorcio que estamos usando el comportamiento de la tensión superficial es diferente al del trabajo mencionado, aunque el motivo de que la tensión disminuyera es el mismo, por la presencia de biosurfactantes, ya que los días en que disminuye fue cuando la actividad emulsificante se elevaba. Estos resultados se pueden observar en la figura

En comparación a otro estudio donde tomaron como fuente de carbono el hexadecano (Sillas Moreno, 2012) el consorcio estudiado tiene un comportamiento parecido, al tener días en donde la tensión superficial disminuye y se eleva y esto es, por el hexadecano que posiblemente se convierta en biosurfactantes. Cuando la tensión superficial vuelve a aumentar puede sugerir que el hexadecano disminuyó en concentración y con esto, que las emulsiones producidas pierden la estabilidad debido al consumo de los biosurfactantes dejando así al hidrocarburo libre.

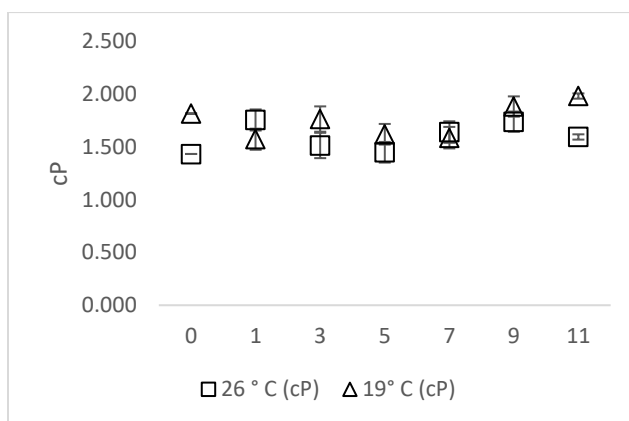
En el trabajo presentado, los biosurfactantes producidos aparentemente si tienen un efecto en la tensión superficial. Khopade *et. al.*, (2012) indica que los biosurfactantes más eficaces son capaces de reducir la tensión superficial del agua de 72 Din cm<sup>-1</sup> a un rango entre 25-30 din cm<sup>-1</sup>; los valores registrados en la temperatura 26°C fue de 107 a 43 din cm<sup>-1</sup> y en la temperatura de 19°C fue de 81.9 a 30.1 din cm<sup>-1</sup>.



**Figura 10.** Resultados obtenidos de la tensión superficial a las temperaturas de 26°C y 19°C con sus respectivos errores estándar.

La viscosidad se midió con un viscosímetro de Ostwald, realizando los cálculos pertinentes y por triplicado para tener sus errores estándar y realizar el ANOVA, el cual no se registraron diferencias significativas entre ambas temperaturas como se pueden observar en la tabla 4. En algunos trabajos donde se analizan bacterias en biorreactores se ha tomado la viscosidad como punto de referencia para saber las características del flujo y así ayudar a la ingeniería del biorreactor (Naranjo, 2014). En este caso se registró la viscosidad para conocer como la temperatura llega a influir en este parámetro y así contribuir en una mejoría para la degradación de hidrocarburo en el BAL. En la figura 10 se muestra los resultados de las dos temperaturas, observando que existe un comportamiento parecido entre las dos temperaturas, siendo la temperatura de 19°C registrada con un valor más alto. Los valores que se registraron para la temperatura de 26°C fueron de 1.4 cP como el valor mínimo en

el primer día y de 1.7 cP como el valor máximo, para la temperatura de 19°C fue el valor mínimo de 1.5 cP y 1.9 cP como el máximo en el día último de toma de muestra. En el trabajo de Ángeles et. al, 2017, reportó una viscosidad de 1.1 cP pero con condiciones de operación diferentes (temperatura de 28°C y 2 ug) y un ALB con una capacidad de 1.2 L, al igual que la fuente de carbono era diésel. Pero podemos comparar que los datos registrados en nuestro trabajo entran en el rango de viscosidad en el que un ALB trabaja para lograr una degradación exitosa.

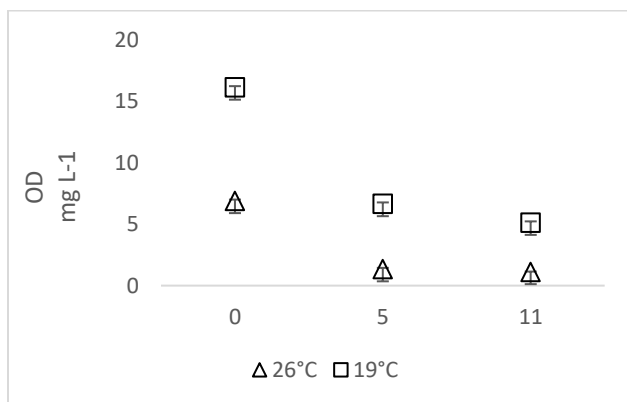


**Figura 11.** Resultados obtenidos del análisis de viscosidad a las temperaturas de 19°C y 26°C, con sus respectivos errores estándar.

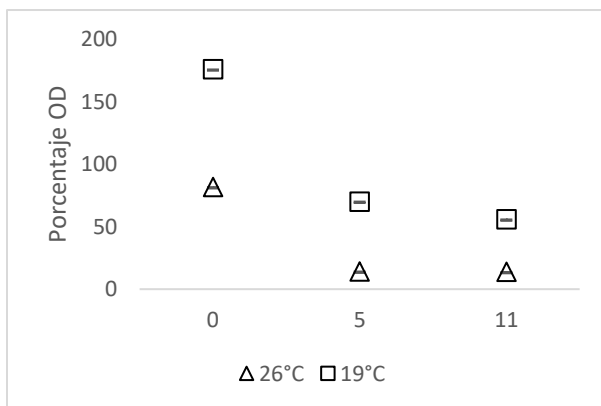
El siguiente parámetro que se midió durante la cinética fue el oxígeno disuelto. Este fue medido con una sonda de oxígeno tipo galvánica marca YSI (mod PRO20). Se midieron los días 0, 5 y 11 ya que se contaba con un número limitado de membranas para la medición.

Los resultados fueron registrados en porcentaje y mg L-1 como se pueden observar en las figuras 11 y 12. El oxígeno disuelto ha sido un parámetro que se ha medido en trabajos de tratamientos de agua, usando BAL. En el estudio de Chen, S. L et. al., 2005, se utilizó un sistema de adquisición online para medir el OD de las aguas residuales en el BAL. Durante el trabajo se observó que el sistema fue influenciado por diversos parámetros, como la Ug y la temperatura. Se concluyó que el OD fue alto lo cual significaría que el proceso de biodegradación fue promovido. También se demostró que al incrementar el Ug no significaba que el proceso de biodegradación incrementaría ya que no existió ningún

cambió en el OD dentro del biorreactor. En nuestro trabajo el Ug se manejó constante, no hubo cambio alguno, y se observó como el OD fue disminuyendo conforme a los días como se muestra en la figura 11, donde el ultimo día obtuvo 1.12 mg L-1 a la temperatura de 26°C y 4.01 mg L-1 a la temperatura de 19°C, lo cual como demuestran en los trabajos anteriores el proceso de biodegradación se realizó en los primeros días de la cinética, donde el OD tenía un nivel alto.



**Figura 12.** Resultados obtenidos al medir el oxígeno disuelto a las dos temperaturas. Con sus respectivos errores estándar.



**Figura 13.** Porcentaje del Oxígeno disuelto a las dos temperaturas registradas. Se realizó por triplicado, con sus respectivos errores estándar.

PARAMETRO	F0	PC	COMPARACIÓN	DECISIÓN
PH	0.31529134	4.75	F0<PC	NO SIGNIFICATIVO
Densidad	175.682927	4.75	F0>PC	SIGNIFICATIVO
Viscosidad	4.09490125	4.75	F0<PC	NO SIGNIFICATIVO
Tensión superficial	2.82404298	4.75	F0<PC	NO SIGNIFICATIVO

**Tabla 3.** Resultados del análisis estadístico ANOVA de los parámetros medidos

### 8.2.2 Evaluación de los parámetros hidrocarbonoclastas. Cinética microbiana e hidrocarburo residual.

En esta sección se muestran los resultados obtenidos en la evaluación de la capacidad hidrocarbonoclasta de un consorcio microbiano. Se evaluó el comportamiento a dos temperaturas.

Para conocer los parámetros que describan el comportamiento del experimento y los resultados obtenidos por medio de la operación del BAL, se aplican los modelos matemáticos descritos anteriormente. Los modelos con el mejor ajuste para cada uno se emplearon para los parámetros biológicos: cantidad de biomasa (sólidos suspendidos), actividad emulsificante y consumo de hidrocarburo. En la tabla 4 se describen los modelos seleccionados para la temperatura de 26°C.

<b>Variable</b>	<b>Modelo matemático</b>	
	Gompertz	Logístico
Sólidos Suspendidos ( $R^2$ )	0.92	<b>0.95</b>
Actividad Emulsificante ( $R^2$ )	<b>0.96</b>	0.92
Consumo de hidrocarburo ( $R^2$ )	<b>0.96</b>	0.90

**Tabla 4.** Valores de  $R^2$  del ajuste de modelos matemáticos a los datos experimentales durante el periodo de trabajo usando hexadecano como fuente de carbono en medio mineral a la temperatura de 26°C

#### Temperatura 26°C

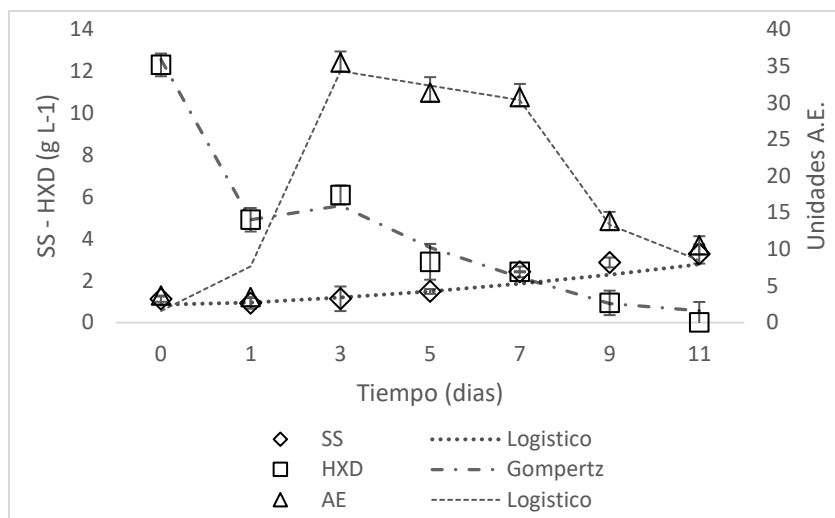
En la figura 13 se observa el crecimiento microbiano a lo largo del periodo de operación del BAL, este crecimiento fue determinado por medio de sólidos suspendidos, los cuales son la generación de biomasa microbiana y metabolitos extracelulares (Hernández *et al.*, 2019). Los sólidos suspendidos aumentaron de 1.1 g L<sup>-1</sup> a 3.2 g L<sup>-1</sup> ± 0.16 g L<sup>-1</sup> al finalizar el periodo del experimento. La tasa promedio de sólidos suspendidos fue de 1.88 g L<sup>-1</sup>. Se ajustó el modelo logístico debido a que su coeficiente de determinación fue el más próximo a 1, con un valor de 0.95. Se observa como el incremento de los sólidos comienza a partir del quinto día de operación debido a la fase de adaptación del consorcio durante los primeros días del



cultivo. Comparando con otro estudio (Medina-Moreno *et al*, 2014) donde se utiliza el mismo consorcio microbiano se observa que el incremento sucede en los mismos días, aunque se generó menos cantidad de sólidos, esto quizás se deba al cambio de las dimensiones del reactor y el tiempo que se tarda en homogeneizar, además que la fuente de carbono varía, siendo diésel y hexadecano. Por medio del modelo logístico se obtuvo el valor de fase lag ( $\lambda$ ) de 1.7 d, un tiempo de inflexión (Ti) de 6.7 d y una tasa de crecimiento máximo ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) de 0.66. Se observa que aun cuando el hidrocarburo ya se encuentra prácticamente agotado, existe un mínimo aumento en la biomasa en los últimos días, esto puede deberse por un posible uso de moléculas bioemulsificantes, probablemente proteínas, lipoproteínas o polisacáridos (Ron y Rosenberg, 2002) y otros bioemulsificantes que contribuyen a la degradación de hidrocarburos (Sakpute, *et al.*, 2010). Los bioemulsificantes probablemente fueron producidos a lo largo de la cinética por una de las cepas del consorcio microbiano (Ángeles, *et al.*, 2017).

La degradación de HXD a lo largo del periodo de operación del biorreactor se inoculó inicialmente con una concentración de  $13.0 \text{ g L}^{-1}$ , durante un periodo de 12 días como se observa en la figura 13. La concentración final del periodo de operación es de  $0.00 \text{ gr L}^{-1}$ , siendo el día 11 el día en donde se degrado por completo. En el trabajo de Medina -Moreno, *et al* 2014, el hidrocarburo se degradó en 7 días en la misma concentración, donde en el cuarto día se había degradado ya un 95% del hidrocarburo y para el día séptimo se había degradado por completo; aunque como se mencionó anteriormente, en este trabajo se usó diésel y las dimensiones del biorreactor eran distintas, teniendo 1L de capacidad. En otro estudio realizado con el mismo consorcio se degradó el diésel hasta pasado el día 15 solo un 86% (Dennis *et al*, 2017), también las dimensiones del biorreactor eran distintas, teniendo una capacidad de 7L y su  $ug$  era de  $1 \text{ cms}^{-1}$ , la cual le agregaron  $20 \text{ gL}^{-1}$  de diésel. Para el consumo de HXD se utilizó el modelo matemático Gompertz ya que fue el que más se ajustó al experimento, obteniendo un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.96. El valor de fase Lag fue de ( $\lambda$ ) 0.98 d, tiempo en el que comienza la degradación del hexadecano, el tiempo de inflexión (Ti) tiene un valor de 6.2 d, mientras que el valor de  $\mu_{M\acute{a}x}$  fue de 5.4 d.

El consorcio microbiano se adaptó en 24h después de ser cultivado. La actividad emulsificante fue evaluada durante un periodo de operación de 12 días en un ALB. Se puede observar que los primeros dos días de cultivo no se detectó actividad emulsificante; comparando con la gráfica de tensión superficial se puede entender que todavía no había presencia de biosurfactantes ni bioemulsificantes. Por tanto, se considera que dentro de los dos primeros días el consumo solo se explica por captación interfacial directa (Ángeles, et, al., 2017). Del tercer día al séptimo día se notó un incremento de la actividad emulsificante, la tensión superficial descendió considerablemente, lo cual se entendería que la remoción del hidrocarburo fue mediada por la producción de biosurfactantes (Tzinzun, 2012). Se utilizó el modelo logístico para predecir el comportamiento experimental de la actividad emulsificante, su coeficiente de determinación ( $R^2$ ) es de 0.96. El tiempo Lag ( $\lambda$ ) tuvo un valor de 2.9 d, valor que comprueba el tiempo que tarda la actividad emulsificante en aumentar, el tiempo de inflexión ( $T_i$ ) de  $5.2 \text{ d}^{-1}$ , y el valor de  $A_{E_{max}}$  fue de  $3.2 \text{ d}^{-1}$ . Por medio de los parámetros obtenidos y el modelo matemático se evalúa la cronología del consorcio microbiano cultivado en el ALB a la temperatura de  $26^\circ\text{C}$ , la cual se puede describir de la siguiente manera: Cerca de las 24h de ser cultivado el consorcio microbiano comienza el crecimiento y la producción de biomasa (SS), 2 días después de esto comienza la degradación de la fuente de carbono, es decir, el hexadecano. A los 6 días aproximadamente se alcanza la velocidad máxima de crecimiento y la máxima de consumo. La actividad emulsificante por otra parte comienza su incremento desde el tercer día; el crecimiento de biomasa se comienza a estabilizar a los 11 días al igual que la degradación de hexadecano es consumida. Se puede observar que a medida que el hexadecano va consumiéndose, el crecimiento de biomasa se va incrementando, ocurriendo a partir del tercer día.



**Figura 14.** Resultados obtenidos para SS, hidrocarburo residual total y actividad emulsificante a 26°C. Las barras de error indican que todos los análisis se realizaron por triplicado. En la ordenada de la izquierda se indica el crecimiento microbiano y el consumo y en la derecha la actividad emulsificante.

#### Temperatura 26°C

<u>Parámetro</u>	<u>Solidos Suspendidos</u>
<b>Fase lag <math>\lambda</math> (d)</b>	1.7
<b>Tiempo de inflexión <math>T_i</math> (<math>d^{-1}</math>)</b>	6.7
<b>Tasa de crecimiento máximo <math>\mu_{m\acute{a}x}</math> <math>d^{-1}</math></b>	0.66
<u>Parámetro</u>	<u>Consumo de hidrocarburo</u>
<b>Fase lag <math>\lambda</math> (d)</b>	0.98
<b>Tiempo de inflexión <math>T_i</math> (<math>d^{-1}</math>)</b>	6.2
<b>Tasa de crecimiento máximo <math>\mu_{m\acute{a}x}</math> <math>d^{-1}</math></b>	5.4
<u>Parámetro</u>	<u>Actividad Emulsificante</u>
<b>Fase lag <math>\lambda</math> (d)</b>	2.9
<b>Tiempo de inflexión <math>T_i</math> (<math>d^{-1}</math>)</b>	5.2
<b><math>A_{em\acute{a}x}</math> <math>d^{-1}</math></b>	3.2

**Tabla 5.** Parámetros obtenidos del ajuste de los modelos matemáticos durante el periodo de trabajo usando hexadecano como fuente de carbono en el ALB a 26°C.

### a) Temperatura 19 °C

Para conocer los parámetros que describan el comportamiento de los experimentos y los datos obtenidos por medio del ALB a la temperatura de 19°C, se aplican los modelos matemáticos descritos anteriormente. Los modelos con el mejor ajuste para cada conjunto de datos se emplearon para obtener los parámetros biológicos, los cuales se describen en la tabla 6.

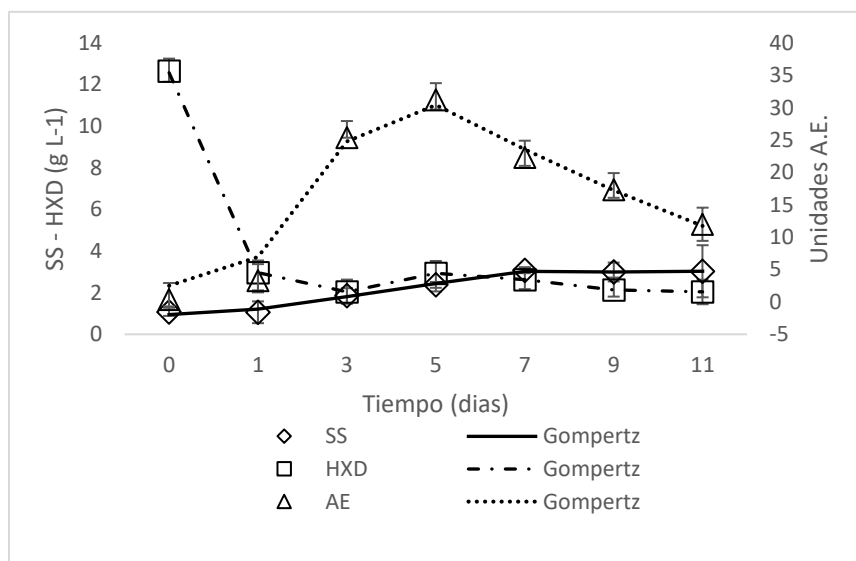
<b>Variable</b>	<b>Modelo matemático</b>	
	Gompertz	Logístico
Sólidos Suspendidos ( $R^2$ )	<b>0.98</b>	0.93
Actividad Emulsificante ( $R^2$ )	<b>0.96</b>	0.90
Consumo de hidrocarburo ( $R^2$ )	<b>0.97</b>	0.94

**Tabla 6.** Valores de  $R^2$  del ajuste de modelos matemáticos a los datos experimentales durante el periodo de trabajo usando hexadecano como fuente de carbono en medio mineral a la temperatura de 19°C.

A continuación, se presenta el crecimiento microbiano a lo largo del periodo de operación del ALB (Figura 14). Este crecimiento fue determinado por medio de sólidos suspendidos; las cinéticas aumentaron de 1.07 g L<sup>-1</sup> al inicio de la operación a 3.02 ± 0.52 g L<sup>-1</sup> al finalizar el periodo del experimento. La tasa promedio de sólidos suspendidos fue de 2.20 g L<sup>-1</sup>. Se ajustó el modelo Gompertz debido a que su coeficiente de determinación fue de 0.98. En este caso existe un incremento en el tercer día, tiempo que tardó el consorcio microbiano en adaptarse en el cultivo. Por medio del ajuste del modelo Gompertz se obtuvo el valor de la fase lag ( $\lambda$ ) de 1.3 d, un tiempo de inflexión ( $T_i$ ) de 2.9 d y una tasa de crecimiento máximo ( $\mu_{\text{máx}}$ ) de 0.17. Se observa que el incremento de sólidos suspendidos se nota desde días antes, a comparación del ALB con la temperatura de 26°C, aunque a los 12 días medidos la biomasa fue mayor con la anterior temperatura. En comparación con otros trabajos donde se utilizó el mismo consorcio (Ángeles, et al., 2017) se puede observar que el incremento de biomasa sucede a las 24h, mientras que en este caso se observa casi a las 48h; de igual forma se generó más sólidos suspendidos en nuestro trabajo, lo cual podemos suponer que

se debe al volumen y capacidad del ALB utilizado en el trabajo de Ángeles, et al., y por ende el cultivo pudo tener un mayor incremento. En la figura 14 se puede observar la evaluación del consumo de HXD durante la operación del ALB a la temperatura de 19°C. Se inoculó inicialmente con una concentración de 13.0 g L<sup>-1</sup>, durante un periodo de 12 días, la concentración al final del periodo de operación fue de 2.03 g L<sup>-1</sup>, pudiéndose observar que a la temperatura de 19°C el consorcio degradó casi por completo el HXD en el doceavo día de cultivo, pero fue una degradación menor que en el experimento anterior. Se obtuvo una tasa de consumo promedio de 3.9 gr L<sup>-1</sup> y degradó 83.9 % en el onceavo y último día de operación. Para el consumo de HXD se usó el modelo Gompertz, al cual se realizó un ajuste con respecto al experimento, obteniendo un coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) de 0.97. El valor del tiempo de retención o tiempo lag ( $\lambda$ ) fue de 1.02d tiempo en el que comienza la degradación, el tiempo de inflexión (Ti) tiene un valor de 2.66d mientras que el valor de QMax fue de 1.90d. El consorcio microbiano se adaptó en un tiempo aproximado de 24h. Se evaluó la actividad emulsificante durante un periodo de 12 días teniendo como sustrato hexadecano y usando el medio mineral como medio (Figura 14), los primeros 2 días de operación no existió un incremento de actividad emulsificante, suponiendo que el consumo de HXD fue realizado por contacto directo. Los días consiguientes la actividad emulsificante aumentó significativamente a medida que el hexadecano se degradó. La producción de emulsificantes comenzó desde el día 1 y alcanzó sus niveles más altos el día 5 (31 UE gL<sup>-1</sup>) para así ir descendiendo hasta el día 11. Esto sugiere la presencia de moléculas con propiedades tensoactivas, pero con una mayor importancia en las propiedades emulsificantes. Estas moléculas se pueden llamar bioemulsificantes, a pesar de su nombre tradicional: biosurfactantes (Ángeles, et al., 2017). Estas moléculas tienen altos pesos moleculares y pueden estar compuestas por polisacáridos, proteínas, lipoproteínas o mezclas complejas de estos biopolímeros. (Ron y Rosenbarg, 2002). El valor de la tasa promedio de la actividad emulsificante a lo largo del periodo de operación del reactor fue de 15.96 g L<sup>-1</sup>. Para evaluar los parámetros cinéticos de la actividad emulsificante se usó el modelo Gompertz para predecir el comportamiento experimental, se usó este modelo matemático debido a que el coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) que más se ajustó tuvo un

valor de 0.96. El tiempo lag ( $\lambda$ ) tuvo un valor de 3.2d, el tiempo de inflexión ( $T_i$ ) de 6.4 d y el valor de  $A_{E_{max}}$  fue de 3.06d. Con los parámetros obtenidos por el modelo matemático, se evalúa la cinética del consorcio microbiano cultivado en el ALB usando HXD como fuente de carbono y medio mineral, lo anterior se describe de la siguiente manera: cerca de las 25h aproximadamente de ser cultivado el consorcio microbiano comienza la generación de biomasa (SS), a las 23 del cultivo el consorcio microbiano comienza la degradación del hexadecano. En aproximadamente 3 días y 9 horas se alcanza la velocidad máxima de crecimiento y la velocidad máxima de consumo. Se puede observar que a 19°C la velocidad máxima fue alcanzada en menor tiempo que a la temperatura de 26°C. Por lo contrario, se necesita más de 11 días para degradar por completo el HXD a la temperatura de 19°C, esto puede deberse por las características de los microorganismos que conforman el consorcio ya que una gran parte (*Pseudomonas* y *Vibrio*) crecen a temperaturas más altas que 19°C (Murray, 2009). A los 3 días comienza el aumento de la actividad emulsificante, a los 7 días se estabiliza el crecimiento de la biomasa y en 11 días el hexadecano se ha degradado casi un 90%.



**Figura 15.** Resultados obtenidos para SS, hidrocarburo residual total y actividad emulsificante a 19°C. Las barras de error indican que todos los análisis se realizaron por triplicado. En la ordenada de la izquierda se indica el crecimiento microbiano y el consumo de hidrocarburo y en la derecha la actividad emulsificante.

**Temperatura 19°C**

<u>Parámetro</u>	<u>Solidos Suspendidos</u>
<b>Fase lag <math>\lambda</math> (d)</b>	1.3
<b>Tiempo de inflexión <math>T_i</math> (<math>d^{-1}</math>)</b>	2.9
<b>Tasa de crecimiento máximo <math>\mu_{m\acute{a}x}</math> <math>d^{-1}</math></b>	0.17
<u>Parámetro</u>	<u>Consumo de hidrocarburo</u>
<b>Fase lag <math>\lambda</math> (d)</b>	1.02
<b>Tiempo de inflexión <math>T_i</math> (<math>d^{-1}</math>)</b>	2.66
<b>Tasa de crecimiento máximo <math>\mu_{m\acute{a}x}</math> <math>d^{-1}</math></b>	1.90
<u>Parámetro</u>	<u>Actividad Emulsificante</u>
<b>Fase lag <math>\lambda</math> (d)</b>	3.2
<b>Tiempo de inflexión <math>T_i</math> (<math>d^{-1}</math>)</b>	6.4
<b><math>A_{em\acute{a}x}</math> <math>d^{-1}</math></b>	3.06

**Tabla 7.** Parámetros obtenidos del ajuste de los modelos matemáticos durante el periodo de trabajo usando hexadecano como fuente de carbono en el ALB a 19°C.

## 9. Conclusiones

### Fase 1

Al inicio de la investigación, se decidió diseñar un biorreactor airlift para poder realizar el experimento. El diseño del ALB fue a partir de la literatura investigada, basándonos en los trabajos de Medina-Moreno et al., 2014 y Lizardi Jiménez et al., 2016. Se utilizó medio mínimo de sales y como fuente de carbono se utilizó el hexadecano como muestra de hidrocarburo de cadena larga que suele haber en las zonas donde existe contaminación de hidrocarburos. Se llegó a acondicionar el ALB para realizar las cinéticas del consorcio y analizar los diferentes parámetros que nos ayudaron a conocer mejor el comportamiento del consorcio a dos temperaturas. Las temperaturas seleccionadas se basaron tanto en las condiciones en que el consorcio se encontraba en su hábitat natural como en las condiciones en las que se podían trabajar en el laboratorio. Los resultados de la evaluación se pueden observar en la fase de cinéticas.

### Fase 2

Al analizar los diferentes parámetros a las dos temperaturas se puede concluir que:

- El pH y la viscosidad no tienen una diferencia significativa en ambas temperaturas. El consorcio se comporta casi de la misma manera con una temperatura de 26°C que con una temperatura de 19°C. Al observar la gráfica se comprueba que la viscosidad tiene una diferencia mínima, la cual puede significar que no existe una variación en sus temperaturas y el biorreactor no tiene un efecto en su operación. La densidad por otra parte muestra una diferencia tanto en la gráfica como en el análisis estadístico. Esto puede deberse por la misma variación de temperatura ya que a menor temperatura, el fluido es más denso. La tensión superficial llegó a tener datos interesantes. En ambas temperaturas tuvo un comportamiento donde en los primeros días no hubo un deceso, lo cual significaba que no existía presencia de biosurfactantes y eso puede igualmente comprobarse con la actividad emulsificante, pero en los siguientes días comenzó a descender. La tensión



superficial en la temperatura de 19°C tuvo un registro de datos más bajos que con la temperatura de 26°C, esto quiere decir que hubo más presencias de biosurfactantes y a su vez que los microorganismos comenzaron a consumir éstos en lugar que el hidrocarburo, es por eso que a la temperatura de 19°C no hubo una degradación al 100 en los 12 días de operación y se necesita más días para que exista una degradación total. El oxígeno disuelto no se pudo medir con tanta precisión por la falta de membranas, lo único que se pudo comprobar es que en ambas temperaturas la degradación comenzó en los primeros días de las cinéticas y existió una mínima diferencia de porcentajes en cada una de ellas.

En general los parámetros medidos nos pudieron demostrar que a pesar de que hubo mínimas diferencias entre las dos temperaturas, si puede existir un efecto al variar este importante factor en la operación del biorreactor para poder degradar hidrocarburos.

- Al analizar las cinéticas en cada temperatura se pudo comprobar que el crecimiento microbiano no tiene una diferencia significativa en ambos biorreactores. Esto quiere decir que las bacterias pueden crecer a una temperatura baja como a una alta, ya que el conjunto de microorganismos que conforman el consorcio tiene características que demuestran que pueden vivir en diferentes ambientes, aunque existió un crecimiento menor en la temperatura baja. Por otra parte, la degradación del hexadecano fue un poco diferente; a una temperatura de 26°C se pudo comprobar que hay una mejor degradación, y esto en parte es por la presencia de biosurfactantes. Como se explicó en el párrafo anterior, diversos parámetros como lo es la tensión superficial, la viscosidad y la actividad emulsificante nos demuestran que existe presencia de biosurfactantes, los cuales influye en la degradación de hidrocarburos, en este caso del hexadecano. Esto quiere decir que a la temperatura de 19°C pudo haber existido una mayor cantidad de biosurfactantes teniendo un claro efecto en el consumo de hexadecano, siendo éstos consumidos en lugar del hidrocarburo. Sin embargo, la actividad emulsificante en los últimos días ya

comenzaba a descender y esto puede indicar que bastaban un par de días más para ser consumido por completo, aunque concluyendo que a una temperatura baja el hexadecano tarda más en degradarse y que en la temperatura de 26°C hubo más consumo por contacto directo que en la de 19°C.

Los biorreactores airlift siempre han sido una de las principales alternativas para la remediación, ya que son económicos, accesibles y han demostrado ser eficaces al degradar compuestos altamente recalcitrantes como son los hidrocarburos. Al estudiar como un factor tan importante como es la temperatura se varía en la operación del biorreactor, se puede aportar como la degradación puede ser mejor y más eficiente. Teniendo en cuenta y analizando los parámetros fisicoquímicos, la temperatura ideal para operar un biorreactor airlift es a partir de los 26°C, donde demuestra que existe una degradación total y un crecimiento que no altera en la operación.

## Bibliografía

Adams R.H., Domínguez V., García L. (1999). Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico mexicano. *Terra*. 17, 159–174.

Angeles, O., Medina-Moreno, S.A., Jiménez-González, A., Coreño-Alonso, A., Lizardi-Jiménez, M.A. (2017). Predominant mode of diesel uptake: Direct interfacial versus emulsification in multiphase bioreactor. *Chemical Engineering Science* 165, 108-112.

Boffetta P, Jourenkova N, Gustavsson P. (1997) Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control* 8:444–472. doi:10.1023/a:1018465507029.

Botello A.V. (2005) Características composición y propiedades fisicoquímicas del petróleo. En: *Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*. (A.V. Botello, J. Rendón von Osten, G. Gold-Bouchot, C. Agraz-Hernández, Eds.) 2ª ed. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología. Campeche, México. pp. 261–268.

Brecht Denis, Oscar Angeles Perez , Manuel Alejandro Lizardi-Jimenez , Abhishek Dutta . (2017). Numerical evaluation of direct interfacial uptake by a microbial consortium in an airlift bioreactor. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 1-10.

Chisti M.Y. 1989. *Airlift Bioreactors*, editorial Elsevier London.

Chisti, Y., Jauregui-Haza, U.J., (2002) Oxygen transfer and mixing in mechanically agitated airlift bioreactors. *Biochem. Eng. J.* 10, 143e153.

Das, N., Y P. Chandran, (2011) Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An Overview. *Biotechnol. Reserch. Internal*. vol. 2011, Article ID 941810, pag. 13, 2011. doi:10.4061/2011/941810.

Díaz-Borrego L. C., J. C. Marín, D. A. Alburgue, S. J. Carrasquero, E. D. Morales. (2017) Consorcio microbiano autóctono para el tratamiento de aguas contaminadas con gasoil del puerto de isla de toas. *Ciencia, tecnología y neogradanina*.

Doble M, Kruthiventi AK, Gaikar VG. (2004). Biotransformations and Bioprocesses. Marcel Dekker, New York, USA.

Di Paola, María, Vicien, Carmen. (2010). Biorremediación: Vinculación entre investigación, desarrollo y legislación. CEUR CONICET.

Fuentes, S., Méndez, V., Aguila, P., & Seeger, M. (2014). Bioremediation of petroleum hydrocarbons: Catabolic genes, microbial communities, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(11), 4781–4794. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5684-9>.

García-Cruz, N. U., Valdivia-Rivera, S., Narciso-Ortiz, L., García-Maldonado, J.Q., Uribe, M.M., Aguirre-Macedo, L. & Lizardi-Jimenez, M.A. (2019). Diesel uptake by an indigenous microbial consortium isolated from sediments of the Southern Gulf of Mexico: Emulsion 73 characterization. *Environmental Pollution* Volume 250, Pages 849-855. doi: 10.1016/j.envpol.2019.04.109.

Ghazali, F. M., Rahman, R. N. Z. A., Salleh, A. B., & Basri, M. (2004). Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54(1), 61–67. doi:10.1016/j.ibiod.2004.02.002.

Gómez-Díaz, D., Navaza, J.M., (2003) Mass transfer in a flat gas/liquid interface using non-Newtonian media. *Chem. Eng. Technol.* 26 (10), 1068–1073.

Hernández- Martínez, R., Quiñonez-Muñoz, T.A., Vázquez, A. & Lizardi-Jimenez, M.A. (2018). Diesel degradation and bioemulsifiers production using bubble-column with a microbial consortium isolated from hydrocarbon-contaminated soil. *Iranian Journal Of Chemistry And Chemical Engineering (IJCCE)* 2018 , Volume 37 , Number 2; Page(s) 213 To 218. DOI: <https://www.sid.ir/En/Journal/ViewPaper.aspx?ID=601515>.

Hernández-Martínez, R., Valdivia-Rivera, S., Betto-Sagahon, J., Coreño-Alonso, A., Tzintzun-Camacho, O., & Lizardi-Jiménez, M. (2018). Solubilization and removal of petroleum hydrocarbons by a native microbial biomass in a bubble column reactor. *Revista Mexicana*

De Ingeniería Química, 18(1), 181-189.  
<https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n1/Hernandez>.

ITOPF. (2017) "Oil Tanker Spill Statistics 2017", The International Tanker Owners Pollution Federation Limited. R <http://www.itopf.com/knowledge-resources/data-statistics/statistics/>, 28 October 2018.

Jiménez H.G., Venegas-Sánchez J.A., Jiménez-Islas D., Rivera-Rios J.M. (2018) Conformación de un consorcio bacteriano para la degradación de Hidrocarburos. CONAMTI 2018 Mecatrónica-Energías Renovables-Sistemas Computacionales-Innovación Agrícola. REVISTA (2018) 5–20, 106-111. ISSN 2395-8510.

Jin. B., Yu. Q., Yan. X.Q., van Leeuwen J. (2001). Characterization and improvement of oxygen transfer in pilot plant external air-lift bioreactor for mycelial biomass production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17: 265-272.

Khopade A., Ren B., Liu X-Y., Mahadik K., Zhang L., Kokare C. (2012). Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces* species B3. *Journal of Colloid and Interface Science*, 367:311-318.

Lizardi-Jiménez, M. A. (2011) "Contribución al estudio de la hidrodinámica y transferencia simultánea de masa en biorreactores airlift de tres fases, producción de un consorcio microbiano degradador de petróleo", Universidad Autónoma Metropolitana.

M. A. Lizardi-Jiménez, G. Saucedo, F. Thalasso, M. Gutierrez-Rojas (2012). Simultaneous Hexadecane and Oxygen Transfer Rate on the Production of an Oil Degrading Consortium in a Three-Phase Airlift Bioreactor, *Chem. Eng. J.* 2012, 187, 160–165.

Lizardi-Jiménez, M. A., R.M Leal-Bautista, A. Ordaz, R. Reyna-Velarde. (2014). Airlift bioreactors for hydrocarbon water pollution remediation in a tourism development pole. *Desalination and Water Treatment* 1-6, DOI: 10.1080/19443994.2013.876670.

Lizardi-Jiménez, M. A., E. Y. López Sánchez, A. Gómez-de-Jesús, N. U. García-Cruz, y C. I. Hernández-Flores, (2016). Sinkhole-Native Oil-Degrading Microbial Consortium for Hydrocarbon-Polluted Seawater Remediation. CLEAN–Soil, Air, Water.

López, T, Dominguez, L & García, J. (2007). Arreglo estructural de un consorcio microbiano de interés alimentario en la producción del vinagre. Trabajo presentado en el octavo Congreso Nacional de Microscopía, octubre, México.

Mahmood K.H.AL-Mashhadani, Stephen J.Wilkinson, William B.Zimmerman. (2015) Airlift bioreactor for biological applications with microbubble mediated transport processes. Chemical Engineering Science Volume 137, 1 December 2015, Pages 243-253.

Medina, M., Huerta, O., and Gutierrez-Rojas, M. (2005). Hydrocarbon biodegradation in oxygen- limited sequential batch reactors by consortium from weathered, oil-contaminated soil. Can. J. Microbiol. 51, 231–239. <http://dx.doi.org/10.3138/jvme.38.2.123>.

Medina-Moreno, S.A., S. Huerta-Ochoa, C.A. Lucho-Constantino, L. Aguilera-Vazquez, A. Jimenez-Gonzalez, y M. Gutierrez-Rojas, (2009). Biodegradation modeling of sludge bioreactors of total petroleum hydrocarbons weathering in soil and sediments. Revista Mexicana de Ingeniería Química 8, 245-258.

Medina-Moreno, S.A., Jiménez-González, A., Gutiérrez-Rojas, M., Lizardi-Jiménez, M. A., de Zempoala Hidalgo, M., (2014) Hydrocarbon pollution studies of underwater sinkholes along Quintana Roo as a function of tourism development in the Mexican Caribbean. Revis. Mexicana de Ingeniería Quím. 13 (2), 509–516.

Merchuk, J., & Gluz, M. (1999). Bioreactors, air-lift reactors. In *Encyclopedia Of Bioprocess Technology Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation* (pp. 320–394).

Naranjo Gómez, Luz Nadezda. (2014). Modelamiento del estado hidrodinámico de un reactor anaerobio por medio de CFD para el estudio del mezclado.

Olgún, E. J., Hernández, M. E., y Sánchez-Galván, G. (2007). Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitorremediación y restauración.

Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 23(3), 139–154. doi:  
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0003-4975%2899%2900477-4>.

Pepi M., Cesàro A., Liut G., Baldi F. (2005) . An antarctic psychrotrophic bacterium *Halomonas* sp. ANT-3b, growing on n-hexadecane, produces a new emulsifying glycolipid. *FEMS. Microbiology Ecology*, 53: 157-166.

Reeves G. (2005). Understanding and monitoring hydrocarbons in water. Oakville, Ontario, Canada: Arjay Engineering LTD.

Ruiz-Leza, H.A R. R. (2007). DISEÑO DE BIORREACTORES PARA FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO. redalyc.

Ron, E.Z., Rosenberg, E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. *Curr. Opin. Biotech.*13, 249–252. doi: 10.1016/S0958-1669(02)00316-6

Salleh, A.B., F.M. Ghazali, R.N.A. Rahman, & M. Basri., (2003). Bioremediation of petroleum hydrocarbon pollution. *Indian Journal of Biotechnology*, 2: 411-425.

Salvi, S. (2007). Health effects of ambient air pollution in children. *Paediatric Respiratory Reviews*, 8(4), 275–280. doi:10.1016/j.prrv.2007.08.008

Samanta SK, Singh OV, Jain RK. (2002) Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol*;20(6):243–8

Sellers, K. (1999) *Fundamentals of hazardous waste site remediation*. Lewis Publishers. 326 pp.

Saravanan P., Pakshirajan K., Saha P. (2009). Treatment of phenolics containing synthetic waste water in an internal loop airlift bioreactor (ILALR) using indigenous mixed strain of *pseudomonas* sp. under continuous mode of operation. *Bioresource Technology*, 100: 4111-4116.

Satpute, S.K., Banpurkar, A.G., Dhakephalkar, P.K., Banat, I.M., Chopade, B.A. (2010).

Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30 (2): 1-18.

Saval S. (2000). Bioremediation: clean-up biotechnologies for soils and aquifers. ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY AND CLEANER BIOPROCESSES. Editores: Olguin E.J., Sanchez G., y Hernandez E. Taylor & Francis. USA

Sillas M., María V. (2012). Estudio del consumo de hexadecano por un consorcio microbiano en un biorreactor airlift.

Stanbury, P. F., Hall, S. J., & Third, T. (2017). Airlift Reactor. In Principles of Fermentation Technology (3rd editio).

Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2017). Chapter 9 - Aeration and agitation (P. F. Stanbury, A. Whitaker, & S. J. B. T.-P. of F. T. (Third E. Hall (eds.); pp. 537–618). Butterworth-Heinemann. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-099953-1.00009-0>

Summersgill M. (2006) Remediation technology costs in the UK & Europe; drivers and changes from 2001 to 2005. In: Telford T, editor. Proceedings of the 5th International GeoEnviro Conference, June 2006, Cardiff-

Tanase, A., Ionescu, R., Chiciudean, I., Vassu, T., Stoica I. (2012). Characterization of hydrocarbon-polluted bacterial strains isolated from oil-polluted soil. International Biodeterioration and Biodegradation 84, 1-5.

Tzintzun-Camacho O., Loera O., Ramírez-Saad H., Gutiérrez-Rojas M. (2012) Comparison of mechanisms of hexadecane uptake among pure and mixed cultures derived from a bacterial consortium. International Biodeterioration and Biodegradation. (EN PRENSA DOI: 10.1016/j.ibiod.2012.01.009).

Valdivia-Rivera, S., Varela-Santos, E. del C., Quiñones-Muñoz, T. A., Hernández-Martínez, R., & Lizardi-Jiménez, M. A. (2019). Production of hydrocarbon-degrading microorganisms using agricultural residues of *Mangifera indica* L. and *Carica papaya* as carbon source. 3 Biotech, 9(2), doi: 10.1007/s13205-019-1574-2

Van-Hamme J.D., Singh A., Ward O.P. (2003) Recent Advances in Petroleum Microbiology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67: 503-549.



Volke, T. & Velasco, J.A. (2002). Remediation Technologies for Contaminated Soils. INE-SEMARNAT, Mexico.

Vunjak-novakovic G, Kim Y, Wu X, Berzin I. (2005) Air-Lift Bioreactors for Algal Growth on Flue Gas : Mathematical Modeling and Pilot-Plant Studies;6154–63.

Xianling L., Jianping W., Qing Y., Xueming Z. (2005) The pilot study for oil refinery wastewater treatment using a gas–liquid–solid three-phase flow airlift loop bioreactor. Biochemical Engineering Journal, 27: 40–44.