



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**Evaluación de la actividad catalítica de la
biomasa de *Aspergillus niger*, pretratada con un
campo eléctrico, en el consumo de hexadecano**

T E S I S

Presentada en la Universidad Autónoma Metropolitana para
obtener el grado de:

Maestro en Biotecnología

Por

Victor Sánchez Vázquez

Director

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Julio 2012.

México D. F. a 26 de Julio de 2012.

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

**Evaluación de la actividad catalítica de la biomasa de *Aspergillus niger*,
pretratada con un campo eléctrico, el consumo de HXD.**

Que presentó el alumno

Victor Sánchez Vázquez

Comité Tutorial

Director: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Asesor: Dr. Ignacio González Martínez

Asesor: Dr. Javier Barrios González

Jurado

Presidente: Dr. Ernesto Favela Torres

Secretario: Dr. Javier Barrios González

Vocal: Dr. Ignacio González Martínez

Vocal: Dr. Carlos Omar Castillo Araiza

Handwritten signatures of the jury members, including the President, Secretary, and two vocal members.A handwritten signature, likely of the student or a representative, located at the bottom of the page.

Contenido

AGRADECIMIENTOS.....	i
RESUMEN.....	ii
ABSTRACT.....	iv
INTRODUCCIÓN.....	vi
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1. Contaminación por hidrocarburos.....	1
1.2. Tecnologías de remediación.....	2
1.2.1. Tecnologías basadas en procesos físicos.....	2
1.2.2. Tecnologías basadas en procesos químicos.....	3
1.2.3. Tecnologías de biorremediación.....	3
1.3. Biorremediación electrocinética.....	4
1.4. Uso de biorreactores para biorremediación.....	5
1.5. Catálisis heterogénea aplicada a biorremediación: Eliminación de compuestos recalcitrantes con células microbianas.....	7
1.5.1. Isotermas de sorción.....	8
1.5.2. Actividad catalítica y metabolismo microbiano.....	10
1.5.3. Fisiología de hongos filamentosos en medio sólido y líquido.....	11
1.6. Relevancia del trabajo.....	13
2. JUSTIFICACIÓN.....	16
3. HIPÓTESIS.....	17
4. OBJETIVOS.....	18
Objetivo general.....	18
Objetivos particulares.....	18
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
6.1. Microorganismo.....	21
6.2. Cultivo sólido.....	21
6.2.1. Medios de cultivo.....	22
6.2.2. Pretratamiento electroquímico.....	23
6.3. Técnica para la reutilización de la biomasa de <i>A. niger</i> en cultivos sólidos.....	23
6.3.1. Efecto del modo de adición de HXD.....	24
6.3.2. Efecto del orden de adición de nutrientes sobre la producción de biomasa y consumo de HXD.....	24
6.3.3. Efecto de la agitación mecánica.....	24
6.4. Reutilización del biocatalizador para el consumo de HXD en medio sólido.....	25
6.5. Reutilización del biocatalizador para el consumo de HXD en medio líquido.....	25
6.5.1. Evaluación de la capacidad de sorción de HXD por el biocatalizador.....	25
6.5.2. Cultivo líquido.....	26
6.6. Técnicas analíticas.....	27

6.6.1.	Cuantificación de biomasa.....	27
6.6.2.	Extracción de HXD	28
6.6.3.	Cuantificación de HXD	28
6.6.4.	Cuantificación de CO ₂ y O ₂	29
6.6.5.	Cuantificación de proteína soluble en el medio.....	29
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
7.1.	Técnica para la reutilización de la biomasa de <i>A. niger</i> en cultivos sólidos.....	30
7.1.1.	Efecto del modo de adición de HXD.....	30
7.1.2.	Efecto de la agitación mecánica	33
7.1.3.	Evaluación de la actividad catalítica de la biomasa reutilizada de <i>A. niger</i> en el consumo de HXD	35
7.2.	Evaluación de la actividad del biocatalizador pretratado, en medio sólido	37
7.2.1.	Consumo específico de HXD	37
7.2.2.	Destino del carbono del HXD consumido.....	39
7.3.	Evaluación de la actividad del biocatalizador pretratado, en medio líquido	41
7.3.1.	Capacidad de sorción de HXD por el biocatalizador	42
7.3.2.	Consumo de HXD en medio líquido	50
8.	CONCLUSIONES.....	53
9.	PERSPECTIVAS	54
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
	Anexo A. Curva estándar para cuantificación de biomasa.....	63
	Anexo B. Balances de Carbono y grado de reducción en cultivo sólido.....	64

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema del mecanismo de una reacción catalítica, de acuerdo a la teoría de Langmuir-Hinshelwood	8
Figura 2. Productividad científica anual medida en artículos relacionados con la remediación de contaminación ambiental asociada a hidrocarburos.	13
Figura 3. Estrategia general seguida durante el trabajo experimental.....	20
Figura 4. Biorreactor electroquímico utilizado para para cultivos sólidos.....	23
Figura 5. Reactores utilizados para cultivos líquidos.....	27
Figura 6. Efecto del modo de adición de HXD al cultivo sólido sin pretratamiento electroquímico.....	31
Figura 7. Esporas de <i>A. niger</i> suspendidas en solución isotónica.	32
Figura 8. Efecto del orden de adición de nutrientes en cultivo sólido sin pretratamiento.	33
Figura 9. Efecto de la agitación mecánica manual sobre la producción de biomasa y el consumo de HXD.....	34
Figura 10. Reutilización de la biomasa producida en un cultivo sólido para consumir HXD en un segundo ciclo de cultivo.	36
Figura 11. Reutilización del biocatalizador pretratado (en el primer ciclo) para el consumo de HXD en un segundo ciclo de cultivo.....	38
Figura 12. Producción de CO ₂ y consumo de O ₂ durante el consumo de HXD en medio sólido.....	39
Figura 13. Cinética de sorción de HXD por el soporte y el biocatalizador.....	42
Figura 14. Isotermas de sorción de HXD por las variantes del biocatalizador sin pretratamiento y pretratado.....	44
Figura 15. Balance de HXD para los experimentos de sorción.....	46
Figura 16. Comparaciones de los valores obtenidos para la capacidad máxima de sorción. ...	49
Figura 17. Cinética de consumo de HXD por el biocatalizador.....	50
Figura 18. Emulsión formada por HXD en el medio mineral asistida por la proteína soluble en medio líquido.....	52
Figura 19. Curva estandar de biomasa contenida en la agrolita.....	63

Índice de Tablas

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo utilizados para producción de biomasa.	22
Tabla 2. Coeficientes de rendimiento en cultivo sólido.	41
Tabla 3. Parámetros del modelo de Langmuir estimados para cada variante del biocatalizador.....	47

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) de CONACyT con la referencia 001465.

Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa.

Mahatma Gandhi

A CRISTOFER Y NOHEMI

POR SU GRAN AMOR, PACIENCIA Y APOYO EN TODO MOMENTO

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Residuos Sólidos del departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Mariano Gutiérrez Rojas. Con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Al Dr. Mariano por permitirme ingresar y realizar mi estancia dentro de su grupo de trabajo, por compartir conmigo tantos conocimientos y experiencias, pero sobretodo, por su rica amistad, gracias.

Al Dr. Ignacio González y al Dr. Javier Barrios por asesorar este trabajo y enriquecerlo con sus acertados comentarios y observaciones.

Al Dr. Ernesto Favela y al Dr. Omar Castillo por la revisión de este documento y por sus valiosos comentarios para enriquecerlo.

A mis compañeros del laboratorio W 103 y 108, a la M. C. Gloria Trejo por su apoyo en el buen funcionamiento de los equipos del laboratorio.

Muy en especial, por su cercanía y amistad: a mí amada Nohemi, Ernesto, Tania y Mariano; por sus palabras y consejos que siempre son para bien y para mejorar no solo como investigador sino como persona.

A mis padres y hermanos, así como mis padres y hermanos adoptivos (mis suegros y cuñados) por estar siempre conmigo.

Muy en especial, a Cristofer por ser cada día el motivo para ser mejor.

RESUMEN

La exposición de microorganismos a campos eléctricos puede modificar su estructura y metabolismo; en consecuencia, su eficiencia en la degradación de contaminantes orgánicos se ve afectada. Actualmente, no se ha entendido con exactitud la naturaleza de las modificaciones provocadas y por qué cambia el metabolismo; se desconoce también si las modificaciones son estables y si se mantienen en generaciones microbianas posteriores.

En este trabajo se propone modificar la actividad metabólica de *A. niger*, mediante un pretratamiento electroquímico, para utilizar la biomasa resultante como un biocatalizador soportado en agrolita. Para la producción del biocatalizador, *A. niger* se cultivó en medio sólido, utilizando un biorreactor cilíndrico horizontal empacado con agrolita como soporte inerte. El biorreactor está provisto de un conjunto de electrodos y dos compartimientos para soluciones electrolíticas. Para el pretratamiento se aplicó una corriente eléctrica de 6 mA durante 24 h, posteriores a la germinación de las esporas. El objetivo del trabajo fue evaluar la producción de biomasa y el consumo de hexadecano (HXD) por el biocatalizador pretratado, en cultivo sólido y en suspensión en medio líquido. En ambos casos, las variables fueron comparadas con un control (sin pre-tratar).

La actividad catalítica determinada a través del consumo específico de HXD por el biocatalizador (mg de HXD consumidos por mg de biomasa producida) en medio sólido y la producción de CO₂ aumentaron 7 y 2.3 veces respectivamente por efecto del pretratamiento. En medio líquido, se analizó la capacidad de sorción de HXD, bajo la hipótesis de que el pretratamiento provoca cambios superficiales en el biocatalizador, incrementando su afinidad por el HXD. Los resultados experimentales se ajustaron al modelo de Langmuir para hacer un análisis comparativo y corroborar la hipótesis. La capacidad máxima de sorción (medida como mg de HXD sorbido por mg de biomasa) aumentó en dos órdenes de magnitud con respecto al control, esto podría ser una de las causas del aumento en la eficiencia de consumo de HXD. El consumo específico en medio líquido aumentó 15 veces por efecto del pretratamiento.

Se demostró que el metabolismo de *A. niger* después del pretratamiento es diferente al control en cultivos líquidos. Los resultados sugieren que el mecanismo de consumo de HXD en cultivo líquido es asistido por la emulsificación asociada a la adsorción de proteína, exportada al medio, en la interfase agua-HXD; de esta manera se podría modificar la biodisponibilidad del HXD disperso en el medio mineral y facilitar su obtención y consumo.

La aportación principal de este trabajo es la propuesta de utilizar un microorganismo previamente modificado por la exposición a un campo eléctrico, como un biocatalizador. Otra aportación es establecer las bases para su utilización en distintos sistemas de cultivo (líquido y sólido), de tal manera que, en un futuro se pueda extrapolar la información obtenida en el laboratorio hasta generar una aplicación enfocada a la remediación de sitios contaminados con hidrocarburos o bien utilizarla para el diseño de biorreactores para el tratamiento de aguas contaminadas con hidrocarburos; por ejemplo: aguas residuales de refinerías.

ABSTRACT

Exposure of microorganisms to electric fields can modify their form and metabolism, and hence their efficiency to degrade organic pollutants is affected, nowadays the modifications caused by electric fields are not exactly understood, also unknown the stability of these modifications and if they are maintained in subsequent microbial generations.

In this paper the biomass of *A. niger* immobilized on an inert support was used as the active phase of a biocatalyst activated by an electrochemical pretreatment. For biocatalyst production, *A. niger* was cultivated in a solid medium using a cylindrical packed bioreactor, perlite was used as inert support, the bioreactor was equipped with a set of electrodes and two compartments for electrolytic solutions, for pretreatment an electric current (6 mA) was applied during 24 h after spores germination. The objective of this paper was to evaluate the biomass production and HXD consumption by the pretreated biocatalyst in solid culture and suspended in liquid medium, in both cases these variables were compared each time with a control (without pretreatment).

Catalytic activity was determined by the specific consumption of HXD by the biocatalyst (mg of consumed HXD per mg of produced biomass), the specific consumption in solid medium and CO₂ production was 7 and 2.5 fold increases respectively by effect of pretreatment. The sorption capacity was analyzed in liquid medium, with the hypothesis the pretreatment caused changes in the biocatalyst surface, turning it more related to the HXD. Experimental results were fitted to the Langmuir adsorption model for make a comparative analysis and corroborate the hypothesis. The sorption capacity (mg of sorbed HXD per mg of biomass) increased by two magnitude orders respecting a control, this could be a cause of increased efficiency on consumed HXD. The specific consumption of HXD in liquid medium was 15 fold increased by effect of pretreatment.

It was demonstrated that the metabolism of *A. niger* after pretreatment was unlike to the control in liquid cultures. The results suggest that the mechanism of HXD consumption after pretreatment in liquid culture was assisted by the emulsification, emulsion formed was associated with the adsorption of protein exported to the medium in the interfase water-HXD, in this way the bioavailability of HXD dispersed in the mineral medium could be modify, and then its consume was easiest.

The main contribution of this paper is the proposal to use as biocatalyst, a microorganism previously modified by the exposure to an electric field, other contribution is lay the groundwork for its use in different culture systems (liquid and solid), so that in a future, the information obtained in laboratory shall extrapolate to generate an application focus to the remediation of contaminated sites with hydrocarbons or use it for design of bioreactors for treatment of contaminated water , *e.g.* refinery wastewater.

INTRODUCCIÓN

La eliminación de hidrocarburos que contaminan el medio ambiente es un tema que ha tenido un interés creciente en las últimas dos décadas; además, en los últimos diez años, la productividad del conocimiento al respecto ha aumentado considerablemente, hasta llegar a más de 1000 publicaciones científicas en el 2011, el 70% de las publicaciones relacionadas con remediación se inclina hacia el uso de métodos biológicos; del resto, el 35% a tratamientos electrocinéticos. Poco se sabe de los efectos simultáneos de un tratamiento electrocinético sobre la movilización de hidrocarburos y la integridad de la microbiota presente en el suelo. En consecuencia, las aplicaciones hacia el desarrollo tecnológico son limitadas, ya que de más de 5000 patentes existentes sobre remediación de sistemas contaminados con hidrocarburos, sólo en 9 hacen uso de métodos electrocinéticos.

La limitante en la aplicación tecnológica de la biorremediación electrocinética radica principalmente en la falta de control de los efectos (movilización de contaminantes y cambios en microbiota presente) de un tratamiento electrocinético directamente en campo, ya que se debe generar un potencial eléctrico muy elevado (mayores a 100 - 300 V) para movilizar a los contaminantes por flujos electroosmóticos y electromigración principalmente, y facilitar su eliminación; pero dependiendo de la magnitud de la exposición de la microbiota a un campo eléctrico, ésta puede inducir pequeñas o grandes modificaciones estructurales o funcionales (actividad metabólica), hasta efectos de inactivación o incluso muerte celular.

Estudios recientes (Velasco-Alvarez y col. 2011) han demostrado que la imposición de un campo eléctrico aumenta la eficiencia de degradación de HXD por *A. niger*; sin embargo, no queda claro el por qué. Se desconoce cuáles son las modificaciones que provoca el campo eléctrico, y qué tan estables son; es decir, no se sabe si estas modificaciones se mantienen con el tiempo o se pierden inmediatamente.

Una opción alternativa a la biorremediación electrocinética es la aplicación de un campo eléctrico, únicamente con el objetivo de modificar el metabolismo microbiano en un biorreactor electroquímico, mas no para movilizar contaminantes y favorecer la biorremediación *in situ*; la propuesta que se plantea en este trabajo es la imposición de un campo eléctrico controlado que modifique el metabolismo de *A. niger* inmovilizado en agrolita (pretratamiento) aumentando su capacidad de mineralización de hidrocarburos.

Este documento se divide en dos partes importantes, en la primera (capítulos 1 – 5) se presenta un análisis bibliográfico sobre los problemas relacionados con la contaminación por hidrocarburos y las tecnologías de remediación existentes; se intenta plasmar el vínculo entre biocatálisis heterogénea y los alcances de este estudio en la eliminación de contaminación por hidrocarburos, asistida por un microorganismo modificado metabólicamente mediante un pretratamiento electroquímico, haciendo énfasis en la importancia de la fisiología de un hongo filamentoso en medios líquidos y sólidos en su eficiencia metabólica; finalmente se establece la hipótesis y los objetivos centrales del trabajo.

En la segunda parte se describe la estrategia experimental llevada a cabo para cumplir con los objetivos; ésta se subdivide en tres etapas: en la primera, se estableció la metodología para reutilizar la biomasa de *A. niger* en medio sólido, con el objetivo de diferenciar entre las variables de operación que pudieran ser generadoras de estrés en *A. niger*. En la segunda, se evaluó el efecto del pretratamiento sobre la actividad del biocatalizador en medio sólido, se midió el consumo específico de HXD, con base en la biomasa producida y se evaluó el destino final del carbono proveniente del HXD consumido, determinando la capacidad de mineralización y la fracción del carbono consumido que se quedó en metabolitos intermediarios no cuantificados. En la parte final se evaluó la actividad del biocatalizador en medio líquido diferenciando entre la actividad superficial (sorción de HXD) y la actividad metabólica (biorreacciones) y los cambios provocados por el pretratamiento electroquímico

En este trabajo se describen de manera parcial las modificaciones superficiales y metabólicas en el biocatalizador provocadas por el pretratamiento; la información obtenida es útil para el

futuro diseño de tecnologías de biorremediación, por medio de bioaumentación (adición de microorganismos), utilizando microorganismos modificados previamente con una corriente eléctrica, que sirvan como biocatalizadores activos en la eliminación de contaminantes de manera más eficiente.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Contaminación por hidrocarburos

Durante las últimas décadas se han desarrollado grandes industrias a nivel mundial, entre ellas, las industrias química, petroquímica y petrolera. El desarrollo industrial ha provocado una gran problemática de contaminación ambiental, tanto en suelos como en cuerpos de agua. De acuerdo a estadísticas de la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA, 2010), cada año se presentan en México un promedio de 550 emergencias ambientales asociadas con materiales y residuos peligrosos, de los cuales el 64% están relacionados con hidrocarburos derivados de actividades petroleras. Por otro lado, las refinerías de petróleo crudo producen un gasto de aguas residuales promedio de entre 3.5 y 5 m³ por cada tonelada de crudo que procesan, estas aguas residuales pueden alcanzar las 3000 ppm de hidrocarburos totales de petróleo, cuya composición varía de acuerdo a los procesos que se lleven a cabo en cada refinería, como pueden ser: destilación, reformado catalítico, cracking catalítico o desulfuración (Zarooni y Elshorbagy, 2006). México en el 2010 procesó 1,184 millones de barriles por día (Mbd) de crudo refinado (PEMEX, 2011), esto podría generar un gasto promedio de aguas residuales de entre 460 000 y 660 000 m³ diarios.

Actualmente se conocen varias tecnologías para la remediación de sitios contaminados con hidrocarburos; éstas involucran procesos fisicoquímicos, térmicos, químicos o biológicos (Volke y Velasco, 2002); de acuerdo al registro de SEMARNAT en diciembre del 2009 había 194 empresas dedicadas a la remediación de suelos contaminados, de las cuales 30 hacían uso de métodos biológicos (SEMARNAT, 2010).

1.2. Tecnologías de remediación

Las tecnologías de remediación de suelos contaminados se pueden clasificar de acuerdo a: (i) la estrategia de remediación, (ii) lugar en que se realiza el proceso y (iii) tipo de tratamiento (Volke y Velasco, 2002). Otra manera de clasificarlos es por el tipo de proceso que llevan a cabo, ya sea físico, químico o biológico.

1.2.1. Tecnologías basadas en procesos físicos

Se conocen algunas tecnologías que operan bajo procesos físicos, en general se utilizan agentes externos; por ejemplo, calor y solventes afines a los hidrocarburos o surfactantes, o campos eléctricos, con la finalidad de desorber los hidrocarburos de la matriz contaminada y eluirlos; estas tecnologías no transforman los contaminantes, simplemente los retiran de la matriz contaminada.

Un ejemplo particular que opera bajo procesos físicos es la remediación electrocinética, esta surgió en los años 90's. En 1995 se diseñó y patentó un proceso denominado LasagnaTM para la remediación de suelos de baja permeabilidad, contaminados con compuestos orgánicos e inorgánicos (Ho y col. 1999). Básicamente consta de la aplicación de una corriente eléctrica por medio de un conjunto de electrodos, en forma de capas, insertados en el suelo. Entre los electrodos insertan capas denominadas zonas de consumo, es ahí donde se atrapan los contaminantes para ser eliminados. La aplicación de la corriente eléctrica promueve el transporte de compuestos con carga diferente de cero (iones y compuestos polares); principalmente, a través de la electroósmosis, (movimiento de las moléculas de agua del ánodo al cátodo), electromigración (migración de compuestos iónicos hacia el electrodo de carga opuesta) y electroforesis (movimiento de compuestos cargados o coloides por la influencia de un campo eléctrico) (Virkyute y col. 2002).

1.2.2. Tecnologías basadas en procesos químicos

Otro tipo de tecnologías de remediación en suelos contaminados involucra la oxidación de los hidrocarburos, para ello utilizan distintos agentes oxidantes, por ejemplo: el reactivo de Fenton, ozono, peroxiácidos, permanganato de potasio, peróxido de hidrógeno y persulfato de sodio activado (Gan y col. 2009). En México, la adición de agentes oxidantes está regulada por la norma NOM-138 de SEMARNAT.

1.2.3. Tecnologías de biorremediación

La biorremediación utiliza las actividades metabólicas de ciertos organismos para degradar, transformar o remover los contaminantes a productos metabólicos inocuos (Volke y Velasco, 2002). La biorremediación se puede llevar a cabo por procesos aerobios o anaerobios. Los métodos convencionales de biorremediación son el composteo y biopilas. También se conocen otras tecnologías de remediación que involucran el diseño y uso biorreactores, éstos tienen la ventaja de operar bajo condiciones fácilmente controladas (Gan y col. 2009).

La microflora presente en ecosistemas naturales tiene cierta capacidad de consumo de contaminantes, al proceso de biorremediación por la microflora originaria del sitio contaminado se le denomina atenuación natural (Solano-Serena y col. 1998). Los principales factores que afectan a la biorremediación son bajas temperaturas, bajos niveles de nutrientes y co-sustratos, biodisponibilidad y ausencia de organismos capaces de degradar hidrocarburos (Romantschuk y col. 2000).

Con la utilización de bacterias se ha demostrado un gran potencial para la biorremediación de sitios contaminados. Por ejemplo, para las tecnologías de biorremediación *in situ* sólo basta con la presencia de bacterias consumidoras, y el proceso se favorece por medio de excavación y mezclado de suelo con nutrientes (bioestimulación), esto ayuda a la movilización de los contaminantes y favorece la volatilización de compuestos ligeros (Romantschuk y col. 2000).

Los hongos filamentosos son otro grupo de microorganismos con gran capacidad de remediación de sitios contaminados, éstos tienen la capacidad de crecer en condiciones ambientales adversas, en matrices como un suelo, con bajas concentraciones de nutrientes y baja humedad (Mancera-López y col. 2008). Estas características hacen interesante el desarrollo de tecnologías de remediación utilizando hongos filamentosos. *Aspergillus niger* es un hongo filamentoso capaz de degradar HXD (como molécula modelo de hidrocarburos alifáticos de cadena larga) en medio sólido y líquido. En medio sólido, inmovilizado en un soporte inerte, su capacidad consumidora es mucho mayor que en medio líquido (Volke-Sepúlveda y col. 2003); además, se ha observado que, en cultivo sólido, es capaz de degradar hasta 717,000 mg (kg de soporte seco)⁻¹ en 15 días (Volke-Sepúlveda y col. 2006).

Las tecnologías de biorremediación se consideran prácticas, eficaces, seguras y factibles para eliminar contaminantes de suelos (Khan y col. 2004); no obstante, en la práctica surgen ciertos inconvenientes y factores que limitan la rapidez con que se desempeñan, como las condiciones ambientales, fisicoquímicas y la cantidad y calidad de los microorganismos del suelo, entre otras; por ello surge la necesidad de buscar métodos alternativos que pretendan aumentar la eficiencia de la biorremediación, uno de ellos es la biorremediación electrocinética

1.3. Biorremediación electrocinética

La biorremediación electrocinética (también llamada electro-biorremediación), es una tecnología híbrida que integra la biorremediación con un tratamiento electrocinético. Se han realizado varios estudios sobre los efectos que provoca la exposición de comunidades microbianas a un campo eléctrico. Se han observado cambios en la actividad deshidrogenasa del suelo y la composición de las comunidades microbianas próximas al ánodo (Lear y col. 2004; Wick y col. 2010). Se ha observado que la presencia de un campo eléctrico de alta intensidad, en 25 días provoca un flujo electroosmótico capaz de arrastrar tanto contaminantes como algunas bacterias en un suelo contaminado con diesel, además de modificar la actividad deshidrogenasa del suelo y disminuir la viabilidad de las células (Seong-Hye y col. 2010).

Los efectos de la aplicación de una corriente eléctrica sobre los microorganismos dependen de la intensidad y duración de la misma, y pueden ser desde pequeños cambios en el metabolismo hasta efectos francamente letales (Thrash y Coates, 2008); algunos trabajos mencionan que la exposición de células a electro-pulsaciones de alta intensidad (25 - 35 kV durante fracciones de segundos) afecta la permeabilidad de la membrana celular, permitiendo introducir compuestos como plásmidos, esta permeabilización a veces tarda algún tiempo antes de regresar a la normalidad (Tessie y col. 2005).

Se han realizado varios estudios con bacterias y algunos otros con levaduras; sin embargo, no se sabe mucho sobre lo que sucede en el caso de los hongos filamentosos. Se ha demostrado que la exposición del micelio de *A. niger*, a un campo eléctrico durante la degradación de HXD, modifica el metabolismo orientándolo hacia rutas catabólicas, aparentemente a nivel de membrana, que favorecen el paso de HXD hacia la célula y su consecuente biotransformación (Velasco-Alvarez y col. 2011); sin embargo, no se sabe con exactitud la naturaleza de las modificaciones provocadas al microorganismo, también se desconoce cuánto tiempo perduran los efectos provocados por la exposición a la corriente eléctrica; por ello, actualmente no es posible proponer una aplicación clara y definida para un problema relacionado con el combate a la contaminación por hidrocarburos

1.4. Uso de biorreactores para biorremediación

Algunas tecnologías de biorremediación hacen uso de biorreactores, en ciertos casos adoptan aspectos operacionales del tratamiento de aguas residuales y los aplican para el tratamiento de suelos y agua contaminados con hidrocarburos. Los biorreactores utilizados pueden operar en continuo o por lote alimentado, en el caso de lotes alimentados se adicionan nutrientes de manera intermitente, o trabajan en lote pero con una aireación constante (Gan y col. 2009).

Uno de los factores limitantes para biodegradación de hidrocarburos en biorreactores es el transporte de oxígeno hacia la fase acuosa, para combatir esa limitante se ha desarrollado una serie de estudios en los que se intenta minimizar las resistencias a la transferencia de masa. Se

han desarrollado técnicas de aireación intermitente en reactores agitados aumentando la eficiencia de depuración de agua contaminada con gasolina y diesel de un 70% a 90% en 22 días (Vieira y col. 2009). Se ha demostrado también en el caso de bacterias que entre mayor es la hidrofobicidad de la superficie celular, mayor es la capacidad de consumo de hidrocarburos (Obueqwe y col. 2009).

Se ha estudiado otro tipo de reactores como los de lecho empacado con lodos, en los cuales la velocidad de agitación es un factor importante para la mineralización de hidrocarburos (Stroud y col. 2009). Así mismo, se ha observado que al utilizar reactores de lecho fluidizado se alcanzan tasas de consumo más elevadas con respecto a tanques agitados o biorreactores de lecho fijo (Holladay y col. 1979); también se ha observado que se puede controlar el crecimiento de biomasa mediante la inmovilización de células lo cual no es posible con los lodos activados. Una clara ventaja que resulta de esto es el ahorro en tratamientos posteriores por el exceso de producción de biomasa, eliminándose problemas de operación como el estancamiento de partículas sólidas (Mowla y Ahmadi, 2007). Sokól (2003) utilizó lodos provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales de una refinería, inmovilizados en partículas e polipropileno, observando una disminución del 90% en la materia orgánica contenida. Otra limitante a la depuración de aguas contaminadas es la solubilidad de los hidrocarburos (del orden de 10^{-9} mg L⁻¹), lo que constituye un serio problema en el diseño de tecnologías para la degradación de hidrocarburos en aguas contaminadas. Por ejemplo, se ha reportado que las tasas de transporte de HXD hacia la fase acuosa son cuatro veces menores que las tasas de transferencia de O₂ en un reactor air-lift, utilizando un consorcio bacteriano degradador de petróleo (Lizardi-Jiménez y col. 2012). Una alternativa para la solución de los problemas de operación en biorreactores es el diseño de biocatalizadores activos, con características superficiales hidrofóbicas que le proporcionen alta afinidad por los hidrocarburos.

1.5. Catálisis heterogénea aplicada a biorremediación: Eliminación de compuestos recalcitrantes con células microbianas

Un *catalizador* químico es un agente que modifica la velocidad de una reacción, promoviendo un mecanismo diferente que abate la energía de activación, y al final permanece sin cambio. Un catalizador puede ser *soportado*, en este tipo de catalizadores, una sustancia activa se encuentra dispersa en la superficie de otra sustancia, no necesariamente activa (soporte). La mayoría de los catalizadores pierden su actividad con el paso del tiempo. Un *biocatalizador* es un sistema biológico que cumple con las características de un catalizador químico, un claro ejemplo de un biocatalizador son las enzimas. Las enzimas modifican el mecanismo de una reacción abatiendo la energía de activación, lo que aumenta la velocidad de la misma. Los microorganismos contienen un conjunto de enzimas que catalizan reacciones sucesivas en las rutas metabólicas, hasta llegar a producir, a partir de un sustrato específico, más células y metabolitos que pueden ser compuestos de interés en el mercado. Un microorganismo, estrictamente, no es un catalizador verdadero, pero su presencia modifica la velocidad de un proceso de fermentación, por esta razón, usualmente se les visualiza como *biocatalizadores*; además, la velocidad de la reacción global es proporcional a la concentración celular y como uno de los productos es el mismo microorganismo (multiplicación celular); a las fermentaciones se les denomina reacciones autocatalíticas. (Smith, 1986). Por ejemplo, Arai y col. (2010) proponen el uso de cuatro cepas fúngicas productoras de lipasas, inmovilizadas en partículas de espuma de poliuretano, como biocatalizadores celulares soportados activos para la esterificación de aceite de soya con metanol para producción de biodiesel. Andrade y col. (2012) encontraron que el uso de *R. oryzae*, *M. circinelloides* y *P. citrinum*, aumentan su actividad lipasa ($20 - 50 \text{ Ug}^{-1}$) cuando se inmovilizan en espuma de poliuretano.

La teoría más popular sobre el mecanismo de una reacción catalítica heterogénea fue propuesta por Hinshelwood en 1927, basada en la teoría de adsorción propuesta por Langmuir en 1915 (Carberry, 1976). La teoría de Langmuir- Hinshelwood propone que el mecanismo de una reacción catalítica se lleva a cabo en tres etapas: sorción de reactivos, reacción y desorción de productos, tal como se ilustra en la Figura 1.

La caracterización de la capacidad de adsorción o sorción es de gran importancia, ya que es una herramienta que proporciona información sobre la concentración de especies activas en el biocatalizador (Carberry, 1976). Esta capacidad puede analizarse por medio de modelos cinéticos o por isotermas (en el equilibrio termodinámico); para el caso de las isotermas, el modelo más aceptado es el propuesto por Langmuir (1916).

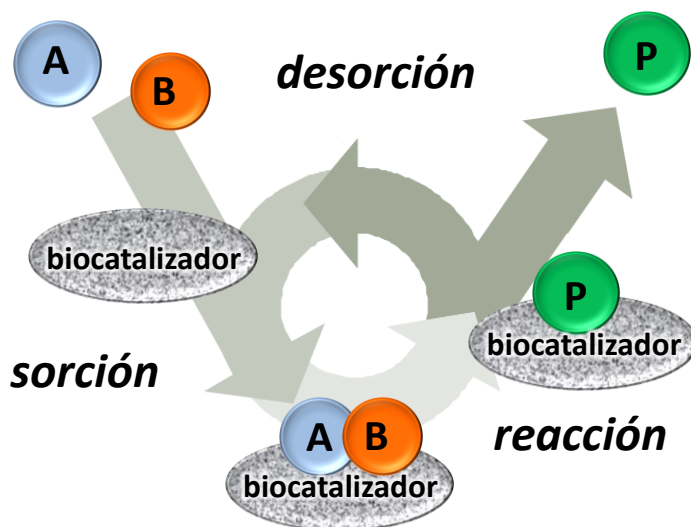
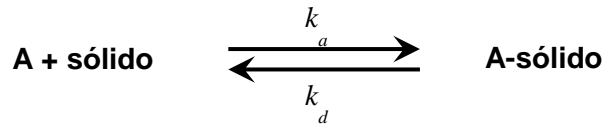


Figura 1. Esquema del mecanismo de una reacción catalítica, de acuerdo a la teoría de Langmuir-Hinshelwood

1.5.1. Isotermas de sorción

La capacidad de adsorción se puede describir mediante el modelo propuesto por Langmuir (1916); en su trabajo clásico se describe la formación de una capa de sorbato que cubre la superficie del sorbente hasta formar una monocapa y saturar al sorbente (Langmuir, 1918). Este fenómeno es debido a choques inelásticos del sorbato sobre la superficie del sólido. También observan dos tipos de sorción; *física* y *química*, cuya diferencia no es del todo evidente, pero propone que las fuerzas intermoleculares involucradas en la sorción física son fuerzas de valencia secundarias principalmente, como fuerzas de Van der Waals; mientras que, en la sorción química, actúan fuerzas de valencia tanto primarias como secundarias, esto trae como consecuencia que la entalpia de la sorción física sea similar a la de un cambio de fase, y en la sorción química sea similar a la de una reacción química.

El modelo de Langmuir se deduce a partir de representar las velocidades de adsorción y desorción en el equilibrio de acuerdo la siguiente ecuación química.



Las velocidades de adsorción (r_a) y desorción (r_d) de la especie A, quedan expresadas de la siguiente manera.

$$\begin{aligned} r_a &= k_a C_A (q_A^* - q_A) \\ r_d &= k_d q_A \end{aligned} \quad (1)$$

Donde C_A representa la concentración de A en la fase fluida, q_A representa la concentración de A adsorbida en el sólido q_A^* representa la concentración de A adsorbida cuando el sólido alcanza la saturación; k_a y k_d son las constantes cinéticas de adsorción y desorción respectivamente.

En el equilibrio las velocidades son de igual magnitud; por lo tanto, al igualar las expresiones de velocidad se obtiene la ecuación 2.

$$q_A = \frac{K_e q_A^* C_A}{1 + K_e C_A} \quad (2)$$

Donde la constante de equilibrio del proceso de adsorción-desorción (sorci3n), se define como

$$K_e = \frac{k_a}{k_d}$$

La ecuaci3n 2, que describe una isoterma de adsorc3n, se expresa en funci3n de dos par3metros; la constante de equilibrio de sorci3n (K_e) y la capacidad m3xima de sorci3n (q_A^*),

ambos son función de la afinidad entre el sorbato y el sorbente (Langmuir, 1916). La ecuación 2 puede multiplicarse y dividirse por K_e para obtener una expresión similar a la ecuación propuesta por Michaelis y Menten para describir la cinética de una reacción enzimática, en este caso, cambia la constante de equilibrio de adsorción por la constante de equilibrio de desorción, que se interpreta como una constante de afinidad K_{Af} .

$$q_A = \frac{q_A^* C_A}{K_{Af} + C_A}; \quad K_{Af} = \frac{1}{K_e} \quad (3)$$

Cabe mencionar que el modelo de Langmuir, que describe un fenómeno de adsorción de gases sobre superficies sólidas, también se aplica para líquidos (Langmuir, 1917). En el caso a tratar en este trabajo, el fenómeno que se estudia en el presente trabajo, teóricamente, es la absorción de HXD (HXD adsorbido en la pared celular que puede difundir en la membrana plasmática y quedar atrapado en la parte hidrofóbica de los fosfolípidos que la integran) por la biomasa adsorbida en la superficie de un soporte inerte; este es un fenómeno de sorción (absorción-adsorción). Aunque físicamente el fenómeno de sorción es diferente de la adsorción, el análisis matemático para la estimación de parámetros termodinámicos, se realiza de manera indistinta por medio de las isothermas de sorción.

La actividad de un catalizador depende de la concentración superficial de sitios afines a los reactivos, por lo cual, el conocer la capacidad de sorción favorece la comprensión e interpretación correcta del comportamiento catalítico (Carberry, 1976).

1.5.2. Actividad catalítica y metabolismo microbiano

Algunos trabajos sobre degradación de hidrocarburos con microorganismos, evalúan su potencial metabólico, visualizando a las células como biocatalizadores para eliminar contaminantes ambientales; el interés se ha enfocado principalmente, en entender la relación entre la biodisponibilidad de los contaminantes, los mecanismos de transporte hacia el interior

de las células y la capacidad de los microorganismos para desarrollarse en los ambientes contaminados (Pieper y Reineke, 2000). Por ejemplo, sobre los mecanismos de consumo de hidrocarburos, Pao y col. (1998), descubrieron tres familias de permeasas simportadoras de hidrocarburos aromáticos policíclicos. También se ha observado que el mecanismo de consumo de HXD por un consorcio bacteriano puede ser por contacto directo y por la emulsificación asistida por un biosurfactante producido por *Acinetobacter. bouvetii*, ellos observaron que a tiempos posteriores a 5 días el consumo de HXD por emulsificación fue predominante (Tzintzun-Camacho y col. 2012).

Los hongos filamentosos conforman un grupo particular, aunque menos estudiado, en la producción de biosurfactantes, éstos tienen la capacidad de producir proteínas de bajo peso molecular, denominadas hidrofobinas, y son capaces de exportarlas al medio como cadenas cortas (hasta cuatro proteínas acopladas). Las hidrofobinas se adsorben y ensamblan sobre interfases aire-agua o aceite-agua, formando emulsiones estables, lo cual modifica la disponibilidad de compuestos insolubles para ser metabolizados (Cox y Hooley, 2009). Además, estos microorganismos tienen la capacidad de desarrollarse en ambientes con baja disponibilidad de nutrientes ya sea en medios sólidos o líquidos, pero se distinguen grandes diferencias fisiológicas en ambos casos.

1.5.3. Fisiología de hongos filamentosos en medio sólido y líquido

Los hongos evolutivamente se han desarrollado en sistemas sólidos, y los productos fúngicos de interés biotecnológico se han descubierto mayoritariamente en sustratos sólidos húmedos. Por ejemplo, el hongo *Piptoporus betulinus*, que crece de manera natural sobre abedul, se cuece al vapor para producir un carbón vegetal con características antisépticas y desinfectantes (Swanton, 1915). Desde las antiguas civilizaciones china y egipcia, los líquenes se han utilizado como materia prima para la producción de colorantes, cosméticos y medicinas (Purvis, 2000). Este desarrollo evolutivo podría ser la causa de que la eficiencia metabólica de los hongos filamentosos sea mayor en fermentación sólida con respecto a fermentación líquida (Barrios-González, 2012).

En las últimas décadas ha aumentado el interés por los cultivos fúngicos en medio sólido, se han observado diferencias importantes en cuanto a productividad; los cultivos en medio sólido son más eficientes con respecto a los cultivos sumergidos ya que se alcanzan concentraciones más elevadas de productos metabólicos utilizando sustratos que pueden ser de menor costo (Colla y col. 2010). Se ha observado también, que el tipo de cultivo influye en las propiedades de los compuestos que se quiere producir; por ejemplo, el tipo de cultivo (sólido o sumergido) influye en las propiedades de pectinasas producidas por *A. niger*, en cuanto al peso molecular y estabilidad a diferentes pH y temperaturas (Acuña-Argüelles y col. 1995). Algunos estudios sobre producción de tanasas con *A. niger* demuestran que en cultivo sólido son totalmente extracelulares, mientras que en cultivos sumergidos la proporción de enzima intracelular a tiempos iniciales es mayor (Lekha y Lonsane, 1994).

Los hongos filamentosos además de tener la capacidad de crecer en condiciones con baja actividad de agua y baja disponibilidad de nutrientes, tanto en cultivos sólidos como líquidos (Gervais y Molin, 2003), también tienen la capacidad de crecer en medios con sustratos hidrofóbicos. Uno de los mecanismos para metabolizar sustratos hidrofóbicos es mediado por la síntesis de proteínas anfipáticas denominadas hidrofobinas (Littlejohn y col. 2012). Las hidrofobinas son proteínas de bajo peso molecular que tienen la capacidad de autopolimerizarse y autoensamblarse en las interfaces del medio en que se desarrollan, se conocen dos tipos de hidrofobinas (clase I y clase II) que difieren principalmente en su solubilidad. Las de clase I son poco solubles en sistemas acuosos y se localizan sobre la superficie de la membrana celular y debajo de la pared celular en forma de oligómeros y ahí se polimerizan y recubren las células con microfibrillas modificando sus propiedades superficiales (Cox y Hooley, 2009); éstas se pueden extraer y utilizar para alterar las propiedades de transporte en interfases sólido-líquido o líquido-líquido, un ejemplo representativo de este tipo de hidrofobinas son las SC3 producidas por *Schizophillum commune* (Wang y col. 2005). Las de clase II son proteínas solubles en sistemas acuosos y son exportadas al medio en forma de oligómeros de entre 1 y 4 monómeros, se incorporan en interfases aire-agua o aceite-agua y polimerizan formando una monocapa anfifílica que modifica la tensión interfacial, este fenómeno favorece la asimilación de aquellos posibles

nutrientes inmiscibles con el agua (Wang y col. 2004; Askolin y col. 2006), este mecanismo le permite a los hongos filamentosos crecer en condiciones en las que los nutrientes no están solubles en el medio acuoso.

1.6. Relevancia del trabajo

La contaminación ambiental asociada a hidrocarburos es un tema que, hasta hace diez años, sólo unos cuantos dirigían su atención. En las últimas dos décadas la comunidad científica, a nivel mundial, ha tomado mayor interés por esta problemática, pero la mayor productividad de conocimientos al respecto se ha generado en los últimos 10 años. En la Figura 2 se observa como ha aumentado la productividad de artículos científicos relacionados con la eliminación de la contaminación ambiental asociada a hidrocarburos; entre 1994 y 2001 se publicaban en promedio 340 artículos al año, a partir del 2002 fue aumentando hasta llegar a más de 1000 publicaciones en el 2011.

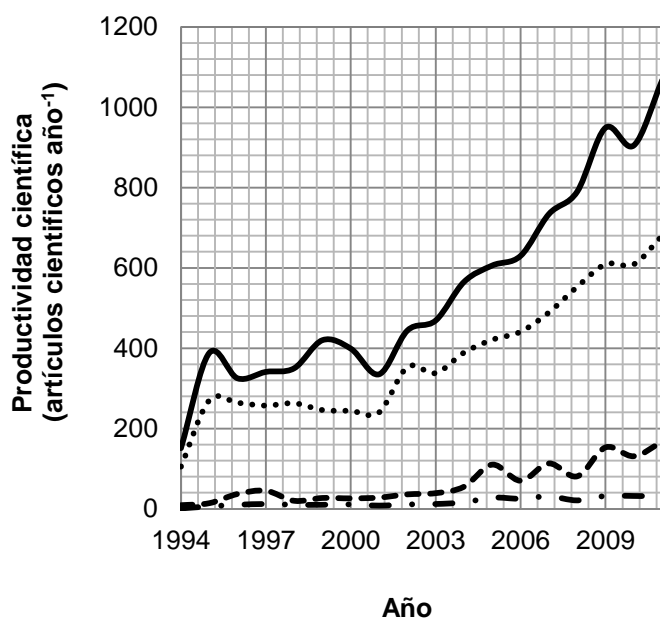


Figura 2. Productividad científica anual medida en artículos relacionados con la remediación de contaminación ambiental asociada a hidrocarburos. Artículos relacionados con: remediación (—), biorremediación (.....), remediación electrocinética (- - -) y biorremediación electrocinética (- · -). Fuente: ScienceDirect (www.sciencedirect.com).

Se observa una tendencia constante en la que casi el 70% de las publicaciones sobre remediación proponen el uso de sistemas biológicos (biorremediación); del 30% restante, el 35% proponen métodos electrocinéticos; sin embargo, poco se ha publicado sobre la combinación entre ambos (biorremediación electrocinética). Sólo el 5% de todas las publicaciones sobre remediación proponen la biorremediación electrocinética. Por otro lado, la base de datos de Free Patents Online (FPO) registra aproximadamente 5100 patentes sobre propuestas de remediación durante los últimos 20 años, de las cuales 1500 son de biorremediación y sólo hay 9 patentes sobre remediación electrocinética, publicadas entre 1995 y 1999, esto va de la mano con un aumento en publicación de artículos científicos durante ese periodo. Por los datos anteriores, se puede observar que el interés de la biorremediación electrocinética, aunque ya se practica desde hace 20 años, apenas empieza a comprenderse y desarrollarse, y el nivel de aplicaciones es todavía limitado.

La remediación electrocinética surgió con el objetivo de movilizar los contaminantes de un suelo y concentrarlos en un volumen menor, para hacer más fácil y económica su remoción o eliminación; en la práctica se ha encontrado el inconveniente de que un campo eléctrico afecta la actividad de la microbiota en el suelo. El problema es que poco se sabe sobre los efectos combinados de la imposición de un campo eléctrico sobre la movilización de los contaminantes y las modificaciones provocadas en las comunidades microbianas presentes que van desde pequeñas modificaciones estructurales o funcionales, hasta inactivación o incluso la muerte. Por lo anterior resulta complicado proponer alguna alternativa práctica y eficaz sobre biorremediación electrocinética. Se ha observado que la aplicación de una corriente eléctrica de baja intensidad sobre el micelio de *A. niger* durante el consumo de HXD, en condiciones controladas y un soporte característico, aumenta su eficiencia, orientando su metabolismo hacia rutas catabólicas.

El presente trabajo contribuye a la comprensión de los fenómenos que modifican la fisiología de *A. niger* por efecto de un pretratamiento electroquímico controlado. Describe de manera parcial los efectos superficiales en el biocatalizador evaluando la capacidad de sorción de HXD; e infiere sobre los cambios metabólicos los cambios metabólicos, evaluando el

consumo de HXD en medios sólido y líquido, siempre comparando con un control (sin pretratamiento electroquímico).

2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, el interés de utilizar sistemas biológicos con fines de remediación de ecosistemas contaminados va en aumento, entre los avances en este campo, se han desarrollado tecnologías para incrementar la eficiencia de biorremediación; un ejemplo es la alteración de los bioprocesos por medio de campos eléctricos para favorecer el metabolismo microbiano.

Se sabe hasta el momento que la aplicación de una corriente eléctrica modifica el metabolismo de *A. niger* favoreciendo el consumo y mineralización de HXD; sin embargo, estos resultados sólo han sido obtenidos bajo condiciones controladas, esto podría limitar la aplicación con fines de biorremediación *in situ* ya que existen variables dentro del ecosistema que no se pueden controlar.

Para contrarrestar la limitante, se propone evaluar la posibilidad de producir *A. niger* en un biorreactor que contiene un soporte inerte sobre el cual crecen los hongos filamentosos. Al sistema hongo-soporte se visualiza como un biocatalizador activado mediante un pretratamiento electroquímico; sin embargo, no se sabe si esa activación se conserva en cultivos posteriores, de ser así, se tendría un sistema altamente eficiente para el consumo de hidrocarburos.

En este trabajo se propone analizar la actividad catalítica de *A. niger* previamente modificado con un campo eléctrico (pretratamiento electroquímico) durante el consumo de HXD. Se investiga si es que las características adquiridas por el pretratamiento se mantienen en un cultivo posterior, tanto en medio líquido como en medio sólido. Se analiza a qué nivel llegan las modificaciones adquiridas y por qué se mantienen; nuestro trabajo permitirá inferir sobre su aplicabilidad y establecer algunas de las bases para proponer, en un futuro, una alternativa tecnológica sobre biorremediación más eficiente, asistida por un microorganismo modificado mediante un pretratamiento electroquímico.

3. HIPÓTESIS

Las modificaciones provocadas por un campo eléctrico en *Aspergillus niger* se manifiestan en un lote de cultivo sucesivo, aumentando su actividad catalítica en el consumo de HXD, en medios sólido y líquido.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad catalítica de la biomasa de *Aspergillus niger* pretratada con un campo eléctrico, en el consumo de HXD en medio líquido y sólido

Objetivos particulares

- Establecer el método de adición de HXD y nutrientes en un biorreactor en medio sólido, para reutilizar el biocatalizador en un lote de cultivo sucesivo.
- Evaluar la capacidad de consumo de HXD por el biocatalizador en un biorreactor en medio líquido (air-lift) y un reactor en medio sólido (empacado con agrolita como soporte inerte).
- Determinar el cambio en la capacidad de sorción de HXD por el biocatalizador, debido al pretratamiento electroquímico.
- A partir de lo anterior, inferir sobre la naturaleza de las modificaciones provocadas por el campo eléctrico sobre *A. niger*

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se ha establecido que la imposición de un campo eléctrico sobre el micelio de *A. niger* durante el consumo de HXD orienta su metabolismo hacia rutas catabólicas, volviéndolo más eficiente en la degradación de HXD ya que aumenta su capacidad de mineralización y disminuye la producción de biomasa; sin embargo, no se sabe si ese comportamiento se conserva en cultivos posteriores, y de ser así ¿por qué? Para resolver esta interrogante principal, la estrategia experimental fue dividida en tres etapas.

La primera fue la estandarización del modo de reutilización de la biomasa de *A. niger* cultivado en agrolita, en medio sólido. Esta etapa se realizó para discernir entre los posibles efectos del modo de reutilización de la biomasa y los efectos derivados del pretratamiento sobre la producción de biomasa y el consumo de HXD.

Una vez establecida la contribución del cambio de ciclo de cultivo, y estandarizado el modo de reutilización del biocatalizador. El siguiente paso fue evaluar el consumo de HXD por la biomasa de *A. niger* en un cultivo sucesivo, evaluando los efectos del pretratamiento, en esta etapa se evaluó la actividad del biocatalizador en el consumo de HXD y el destino del carbono proveniente del HXD consumido.

La última etapa fue la evaluación de la actividad del biocatalizador pretratado, en cultivo líquido. En esta etapa se evaluaron dos fenómenos independientes: la capacidad de sorción, y el consumo de HXD. Esto con el objetivo de realizar una caracterización parcial de la actividad catalítica, de acuerdo a la teoría de Langmuir-Hinshelwood. La estrategia experimental descrita en esta sección, se muestra esquemáticamente en la Figura 3.

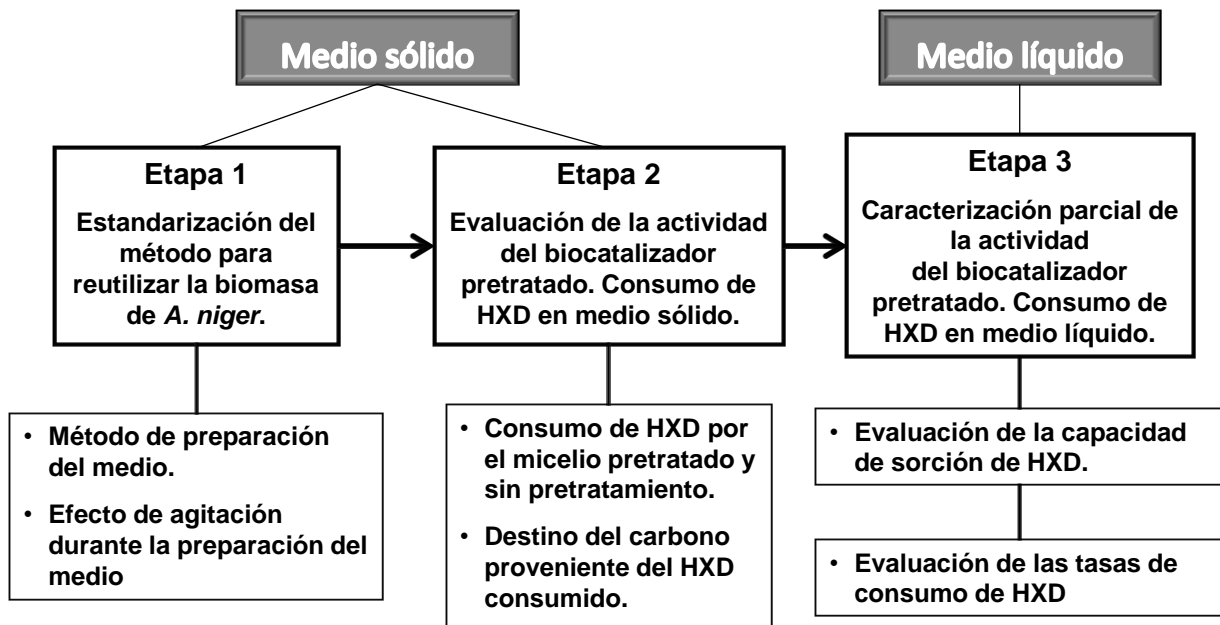


Figura 3. Estrategia general seguida durante el trabajo experimental

Es importante aclarar que la actividad catalítica se determinó de manera indirecta a través del consumo específico de HXD, es decir, la cantidad de HXD consumido por la cantidad de biomasa producida en el biocatalizador soportado.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización del trabajo experimental se utilizó un biorreactor electroquímico en fase sólida en donde se cultivó *A. niger*; posteriormente se realizó un cultivo sucesivo en medio sólido y en medio líquido, utilizando un biorreactor air-lift, en donde se evaluó la capacidad del biocatalizador para consumir HXD. Las características de los biorreactores, propagación de la cepa y las técnicas analíticas utilizadas así como el conjunto de experimentos se describen a continuación.

6.1. Microorganismo

La cepa utilizada fue *A. niger* ATCC 9642. La propagación se realizó en matraces con 50 mL de agar de papa-dextrosa (PDA); se sembró por estría y se mantuvo durante 7 días a 30°C hasta la producción de esporas. Las esporas fueron cosechadas utilizando una solución de Tween 80 (0.05%) y la suspensión sirvió de inóculo para el cultivo sólido. Para el control del inóculo los conteos se realizaron con una cámara de Neubauer hasta ajustar 2.0×10^6 esporas (g de soporte inerte seco)⁻¹. La cepa fue almacenada en tubos inclinados con PDA a 4°C, estos se sembraron cada 2 meses. Para conservar la cepa se mantuvo en refrigeración a -70°C en una solución de glicerol (15% v/v) en criotubos de 1.5 mL.

6.2. Cultivo sólido

Los cultivos sólidos se realizaron en un reactor cilíndrico horizontal (ver sección 6.3.2.) empacado con 15 g de soporte inerte seco. Como soporte inerte se utilizó Agrolita (Dicalite de México) previamente separado de acuerdo al tamaño óptimo (1.19 mm - 1.68 mm) (Velasco-Alvarez y col. 2011), se impregnó con HXD (SIGMA-ALDRICH, 99%) (180 mg (g de agrolita seca)⁻¹) disuelto en hexano (20% v/v); posteriormente, se extendió en charolas para evaporar el hexano a temperatura ambiente. La agrolita impregnada se esterilizó en autoclave a 15 psi durante 20 min y se adicionaron 2.33 mL (g de agrolita seca)⁻¹ del medio de cultivo

MB que se detalla en la Tabla 1, la humedad inicial fue del 75% y el pH 5. Los cultivos sólidos se mantuvieron a 30°C durante 12 días, las variables de respuesta fueron: producción de biomasa, consumo de HXD, producción de CO₂, y consumo de O₂. La biomasa de *A. niger* producida durante el primer ciclo de cultivo sólido, que esta inmovilizada y pretratada electroquímicamente (ver sección 6.2.2), es el biocatalizador, cuya actividad catalítica se evaluara en un segundo ciclo de cultivo sucesivo solido y en un cultivo líquido.

6.2.1. Medios de cultivo

En la Tabla 1 se muestran los diferentes medios de cultivo utilizados para la obtención de biomasa y para los experimentos de consumo y sorción de HXD. Donde MA es el medio utilizado para la obtención de biomasa, MB es el medio para los experimentos de consumo de HXD en medio sólido y ML es el medio utilizado para los experimentos de sorción y consumo de HXD en medio líquido, los Medios MA y MB fueron los que utilizaron Velasco-Alvarez y col. (2011).

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo utilizados para producción de biomasa (MA), consumo de HXD en medio sólido (MB) y consumo de HXD en medio líquido (ML).

Componente	MA (g L ⁻¹)	MB (g L ⁻¹)	ML (g L ⁻¹)
NaNO ₃	5.1	21.23	3
KH ₂ PO ₄	0.6	3.004	1
MgSO ₄	0.45	0.882	0.15
KCl	0.3	3.05	0.5
Extracto de levadura	3	-	-
Sacarosa	20	-	-
HXD (mg (g de soporte) ⁻¹)	-	180	1.3
Oligoelementos* (mL L ⁻¹)	6	6	2

*La solución de oligoelementos está compuesta (expresado en g L⁻¹) de: 0.100 FeSO₄·7H₂O, 0.015 CuSO₄·5H₂O, 0.161ZnSO₄·7H₂O, 0.008 MnSO₄·7H₂O.

6.2.2. Pretratamiento electroquímico

El biorreactor utilizado para los cultivos sólidos está construido de acrílico con un volumen de 600 mL, está provisto de dos compartimentos para los electrodos (construidos de titanio recubierto de óxido de rutenio, con una superficie de contacto de 14.13 cm^2) y dos depósitos para soluciones electrolíticas (0.1M KH_2PO_4) (ver Figura 4). El cuerpo del reactor se empacó con la agrolita impregnada de HXD, medio mineral e inóculo. Posteriormente a la germinación de esporas (4.5 d) se aplicó una corriente eléctrica de 6 mA sólo durante 24 h, y se dejó continuar el cultivo, sin corriente eléctrica, hasta completar 12 días.

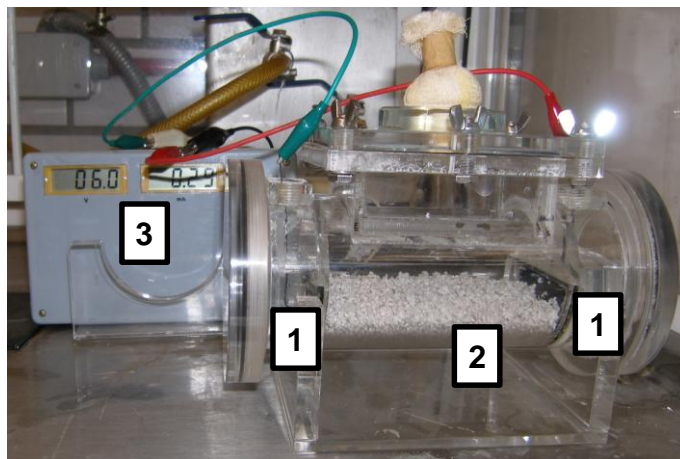


Figura 4. Biorreactor electroquímico utilizado para para cultivos sólidos. (1) Compartimientos para soluciones electrolíticas y electrodos, (2) cuerpo del reactor, (3) fuente de poder externa para la aplicación del pretratamiento electroquímico.

6.3. Técnica para la reutilización de la biomasa de *A. niger* en cultivos sólidos

Para establecer y estandarizar la técnica para la reutilización de la biomasa de *A. niger* se consideraron tres variables importantes: (i) El modo de adición de HXD al medio (disuelto en hexano o directo y sin hexano como disolvente). (ii) El orden de la adición de nutrientes (HXD y medio mineral), para el caso de adición directa y sin hexano. (iii) La agitación manual del medio para homogeneizarlo al agregar los nutrientes. Los experimentos derivados de estos razonamientos se describen a continuación.

6.3.1. Efecto del modo de adición de HXD

Para evaluar el efecto del modo de adición de HXD al medio sólido se realizaron dos cultivos sólidos, uno de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 6.3 y en el otro, el HXD se adicionó sin hexano como disolvente. Los ensayos se realizaron por triplicado, las variables de respuesta fueron la producción de biomasa y consumo de HXD con el tiempo.

6.3.2. Efecto del orden de adición de nutrientes sobre la producción de biomasa y consumo de HXD

Para el caso en que la adición de HXD al soporte fue directa y sin hexano como disolvente, se realizaron dos experimentos independientes, en un caso se adicionó primero el medio de cultivo seguido del HXD y en el otro se invirtió el orden. Las variables de respuesta fueron la concentración de biomasa y HXD con el tiempo, los ensayos se realizaron por triplicado.

6.3.3. Efecto de la agitación mecánica

La manera de homogeneizar el medio sólido fue empleando agitación mecánica manual, se utilizó una espátula y se giró en sentido horario y antihorario, 20 vueltas para cada sentido y atendiendo evitar el rompimiento de las partículas de agrolita. Para evaluar los efectos de la agitación mecánica, se realizaron cuatro experimentos por triplicado. Tres se agitaron, una vez, a distintos tempos de cultivo: 6, 8 y 10 días; y continuaron sin agitación hasta 12 días, se compararon con un control (sin agitación). Las variables de respuesta (producción de biomasa y consumo de HXD) se determinaron a los 12 días de cultivo.

Se realizó un análisis de varianza de los resultados obtenidos en este experimento y una prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha = 0.05$).

6.4. Reutilización del biocatalizador para el consumo de HXD en medio sólido

En este experimento se realizaron dos cultivos sólidos sucesivos de 12 días cada uno. Se aplicó el tratamiento electroquímico sólo en el primer ciclo de cultivo y se comparó con un control (sin pretratamiento). Al terminar el primer ciclo de cultivo, se adicionaron HXD ($180 \text{ mg (g de cultivo)}^{-1}$) y medio de cultivo (para restablecer las condiciones iniciales del primer cultivo), se evaluaron la producción de biomasa y consumo de HXD al final de cada cultivo y se cuantificó la producción de CO_2 con el tiempo, únicamente para el segundo ciclo de cultivo.

Para cuantificar la producción de CO_2 (sólo en el segundo ciclo de cultivo) se realizaron cultivos independientes en botellas serológicas de 150 mL. Se tomaron 3 g de cultivo, se adicionó HXD ($18 \text{ mg (g de cultivo)}^{-1}$) y medio de cultivo (diluido 1:10 para mantener las proporciones de nutrientes con respecto al HXD y las condiciones iniciales del primer cultivo). El espacio gaseoso se cambió cada 24 h, después de cada medición de CO_2 y O_2 .

6.5. Reutilización del biocatalizador para el consumo de HXD en medio líquido

En esta etapa experimental se evaluó la capacidad de sorción y la cinética de consumo de HXD en cultivo líquido por el biocatalizador pretratado, las variables de respuesta se compararon con el caso de la biomasa inmovilizada en agrolita, sin el pretratamiento.

6.5.1. Evaluación de la capacidad de sorción de HXD por el biocatalizador

En este experimento se analizaron los cambios producidos por la aplicación del pretratamiento, en la capacidad de sorción de HXD por el catalizador. Se utilizaron botellas serológicas de 150 mL, con 50 mL de medio ML adicionado con 2600 mg mL^{-1} HXD para establecer las cinéticas de sorción para cada variante del biocatalizador. Posteriormente, para establecer las isotermas de sorción, se realizaron experimentos utilizando las siguientes

concentraciones de HXD: 325, 650, 1300, 2600 y 5200 mg L⁻¹, y un control, sin HXD; se adicionaron 3 g L⁻¹ del biocatalizador y se dejó en agitación a 200 rpm a 30°C durante 48 h. Se analizaron las distintas variantes del biocatalizador (agrolita, agrolita con *A. niger* vivo y muerto sin pretratamiento y agrolita con *A. niger* vivo y muerto después del pretratamiento). Para los tratamientos con *A. niger* muerto, se esterilizó en autoclave a 15 psi durante 20 min. Al finalizar el experimento, se determinó la concentración de HXD en ambas fases, sólida y líquida.

Los resultados se analizaron por medio de regresión no lineal basado en el algoritmo de Levenberg-Marquardt (Levenberg, 1944) para estimar los parámetros cinéticos del modelo de Langmuir y de esta manera comparar cuantitativamente la capacidad de sorción para cada tratamiento.

6.5.2. Cultivo líquido

Los cultivos líquidos se realizaron en un biorreactor de lecho fluidizado neumáticamente, tipo air-lift de tubo concéntrico; el reactor cuenta con un sistema de distribución y control de aire y un control de temperatura. Dentro del cuerpo del reactor se instaló un dispositivo estático rompe espuma (ver Figura 5). El volumen real fue de 1L de medio ML, se inoculó con 5 g L⁻¹ del biocatalizador.

Los cultivos se mantuvieron a 30°C durante 48 h con una aireación continua suministrada a una velocidad lineal de la fase gaseosa de 6 cm s⁻¹, el pH inicial se ajustó a 5. Las variables de respuesta fueron: consumo de HXD, producción de proteína soluble en el medio, tensión superficial (utilizando un Tensiómetro de burbuja SensaDyne QC6000, USA) y pH (utilizando un potenciómetro OAKTON pH 1100 Series); las variables fueron medidas cada 6 h.

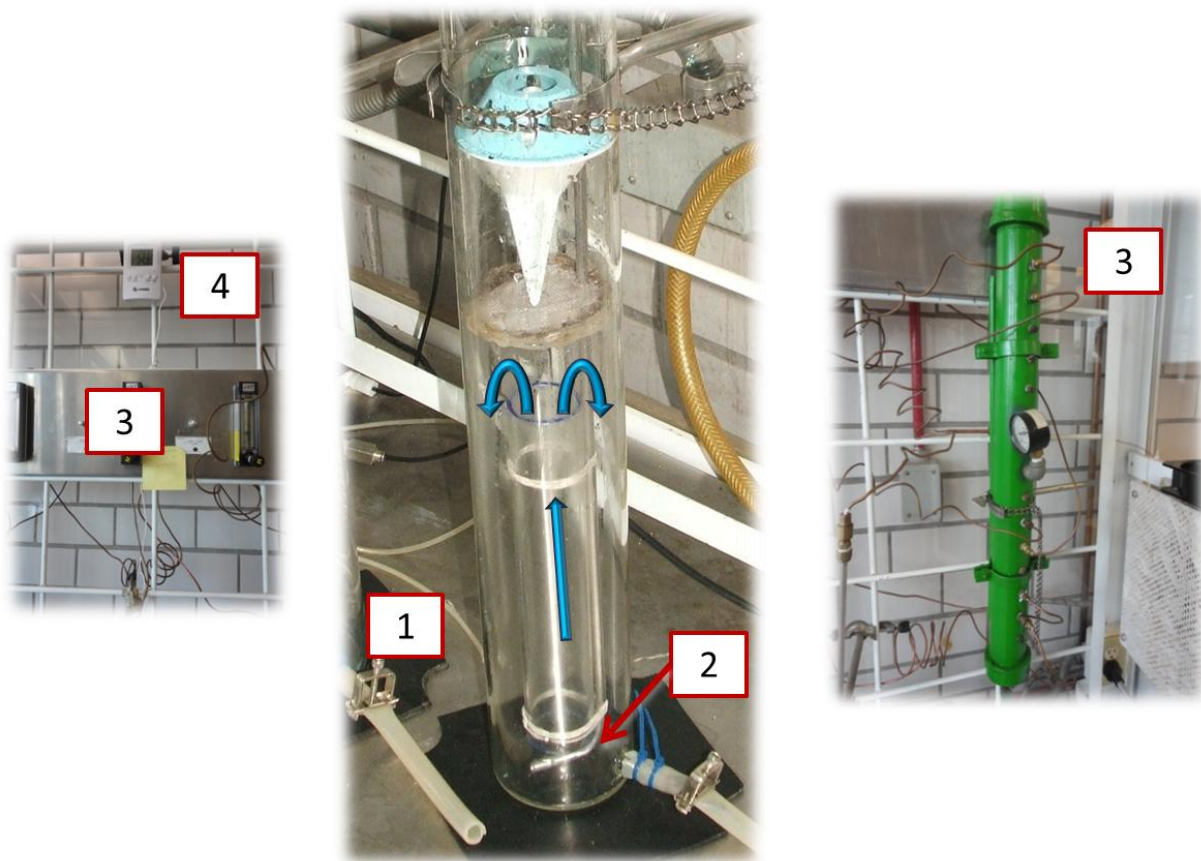


Figura 5. Reactores utilizados para cultivos líquidos, sistema de control y distribución de aire (2, 3) hacia el cuerpo el reactor (1) y un control de temperatura (4).

6.6. Técnicas analíticas

6.6.1. Cuantificación de biomasa

La biomasa producida se estimó a través de la cuantificación de proteína por el método de Lowry (1951), se utilizaron los reactivos comerciales de Bio-Rad Dc protein Assay Kit y biomasa de *A. niger* (obtenida en el laboratorio) como estándar.

Para solubilizar la proteína contenida en la biomasa, se tomaron 0.5 g de muestra (agrolita-biomasa) seca y pulverizada, la biomasa se hidrolizó en 10 mL de una solución de 0.5 N NaOH durante 10 minutos en un baño de agua en ebullición. Después de la hidrólisis se filtró el sobrenadante y se tomaron 200 μL , se agregaron 100 μL de reactivo A (solución alcalina de tartrato de cobre) y 800 μL de reactivo B (reactivo Folin-Ciocalteu diluido), los tubos se

agitaron y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se leyó la absorbancia en una longitud de onda de 655 nm en un espectrofotómetro Varian Cary 50. Se utilizó la solución de NaOH tratada bajo las mismas condiciones que las muestras, como blanco. Las curvas de calibración se realizaron a partir de biomasa de *A. niger*. La biomasa se propagó en matraces Erlenmeyer con medio MA, a 30°C durante 32 h; la biomasa obtenida se filtró al vacío con papel Whatman 42, se lavó con agua destilada para retirar las sales del medio, se dejó secar a 60°C durante 24 h y se pulverizó. La estimación de la biomasa se realizó mediante curvas de calibración obtenidas con concentraciones conocidas de biomasa de *A. niger* medidas como mg de biomasa por g de materia seca (ver anexo A)

6.6.2. Extracción de HXD

6.6.2.1. Extracción sólido-líquido

Para la cuantificación de HXD contenido en el biocatalizador se realizó una extracción sólido-líquido asistida por microondas utilizando un equipo MARS 5 CEM. Se tomó 1 g de muestra seca y se suspendió en 10 mL de una mezcla hexano-acetona (1:1), la extracción se realizó durante 15 min a 150 °C. Se filtró 1.5 mL del extracto y se cuantificó la concentración por cromatografía de gases.

6.6.2.2. Extracción líquido-líquido

Para la cuantificación de HXD suspendido en el medio líquido, se realizó una extracción líquido-líquido. Se tomaron 5mL del cultivo líquido y se mezclaron con 5mL de una mezcla hexano-acetona (1:1). La mezcla se agitó y se dejó en reposo durante 30 min. Se cuantificó la concentración de HXD en la fase orgánica por cromatografía de gases.

6.6.3. Cuantificación de HXD

Se cuantificó por cromatografía de gases utilizando un equipo Varian 3900 con un detector de ionización de flama (a 290°C), se utilizó una columna capilar Alltech 16367 (15m x 0.25mm x

0.1 μ m) y Helio como gas acarreador, con un flujo de 30mL/min. La temperatura de la columna fue de 120°C inicialmente posteriormente se incrementó a 200°C a 30°C/min. Se utilizaron estándares externos.

6.6.4. Cuantificación de CO₂ y O₂

La producción de CO₂ y consumo de O₂ se cuantificó por cromatografía de gases, utilizando un equipo GOW-MAC, con una columna concéntrica Alltech A CTR 1(50°C) y un detector de conductividad térmica (115°C); se utilizó Helio como gas acarreador con un flujo de 40 mL min⁻¹.

6.6.5. Cuantificación de proteína soluble en el medio

La cuantificación se realizó por el método de Lowry (1951), utilizando los reactivos comerciales de Bio-Rad Dc protein Assay Kit. Se tomó 1 mL del medio líquido, se centrifugó a 8000 rpm durante 10 min; se tomaron 200 μ L del sobrenadante y se le aplicó el mismo tratamiento que a los filtrados de la biomasa hidrolizada (ver sección 6.7.1). La curva patrón se realizó a partir de un estándar de seroalbúmina bovina contenida en el Kit.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Técnica para la reutilización de la biomasa de *A. niger* en cultivos sólidos

Dada la falta de información sobre la posibilidad y la manera de reutilizar un cultivo microbiano en un soporte inerte, como el que se propone como biocatalizador; así como, los posibles efectos del cambio de un cultivo a otro, sobre la actividad metabólica del microorganismo, se evaluaron algunas variables de operación como, el modo y orden de adición de nutrientes inmiscibles entre sí (HXD y medio mineral) y la agitación empleada para homogeneizar el cultivo; así como, la influencia que tienen sobre la capacidad de consumo de HXD y producción de biomasa. El efecto de estas variables se determinó en el biocatalizador sin la aplicación del pretratamiento.

7.1.1. Efecto del modo de adición de HXD

La primera variable considerada como importante fue el efecto del modo de adición de HXD sobre la producción de biomasa y el consumo de HXD. Tratando de simular las condiciones ambientales en la biorremediación de un sitio contaminado con hidrocarburos, donde el microorganismo entraría en contacto directo con éstos. Los experimentos se realizaron evaluando el efecto de adicionar HXD directamente y sin hexano como disolvente, comparándolo con el caso control (disuelto en hexano). En la Figura 6 se muestran las variaciones de la concentración de HXD y de biomasa con el tiempo de cultivo. Se puede observar que en las cinéticas de consumo de HXD y producción de biomasa no hay diferencia por la manera de adicionar el HXD en el medio.

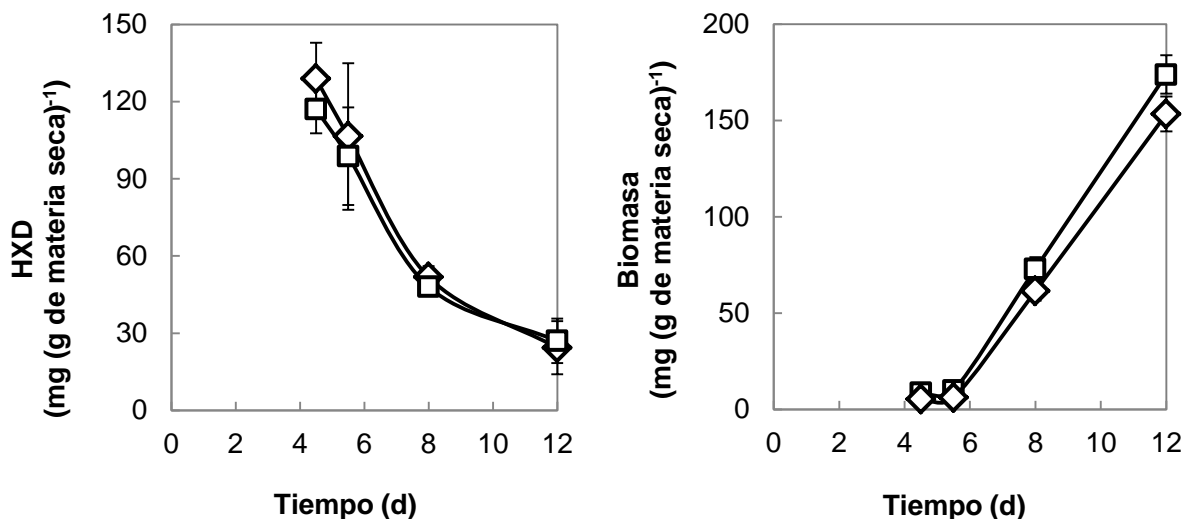


Figura 6. Efecto del modo de adición de HXD al cultivo sólido sin pretratamiento electroquímico. Consumo de HXD (izquierda) y producción de biomasa (derecha) por el cultivo adicionando HXD directo y sin hexano como disolvente (◊) y disuelto en hexano (◻). Se utilizó el medio MB.

La Figura 6 muestra, que la manera de adicionar HXD al soporte no es una variable que afecte la actividad del biocatalizador, tanto la producción de biomasa como el consumo de HXD son similares e independientes de esta variable. Se observa un incremento en la concentración de biomasa de aproximadamente $100 \text{ mg (g de materia seca)}^{-1}$ entre los días 8 y 12, con una disminución en el consumo de HXD, aproximadamente $20 \text{ mg (g de materia seca)}^{-1}$, esto podría ser debido a que el HXD en este periodo se encuentra parcialmente oxidado, de tal manera que ya no se puede cuantificar, pero tampoco se ha transformado hasta biomasa; es decir, puede estar como algún metabolito intermediario.

El uso de hexano en nuestros experimentos sólo fue para facilitar la homogeneización del HXD en el medio, el resultado anterior indica que *A. niger* puede estar en contacto directo con HXD sin que se afecten la capacidad de producción de biomasa y consumo de HXD. Con estos resultados, surgió otra interrogante relacionada con el orden de adición de nutrientes; ya que la fuente de carbono y el resto de nutrientes se encuentran en fases inmiscibles (orgánica y acuosa), y la interacción del microorganismo con los nutrientes solubles en agua puede limitarse, debido a la alta hidrofobicidad de la biomasa (Zhang y col. 2011); Young y col. (2012) mencionan que las hifas de hongos filamentosos creciendo en suelos, forman una red

sobre los poros de la matriz y esto puede generar repelencia al agua debido a la hidrofobicidad celular, por lo anterior el contacto de la biomasa con la fase orgánica podría ser preferencial con respecto a la fase acuosa y limitar el metabolismo de *A. niger* por la baja disponibilidad de nutrientes solubles en agua. En la Figura 7 se aprecia cómo las esporas de *A. niger*, al estar en contacto con gotas de HXD, se aglomeran dentro de ellas y se limita el contacto con el medio mineral, a diferencia de las esporas en ausencia de HXD que se encuentran dispersas en el medio.

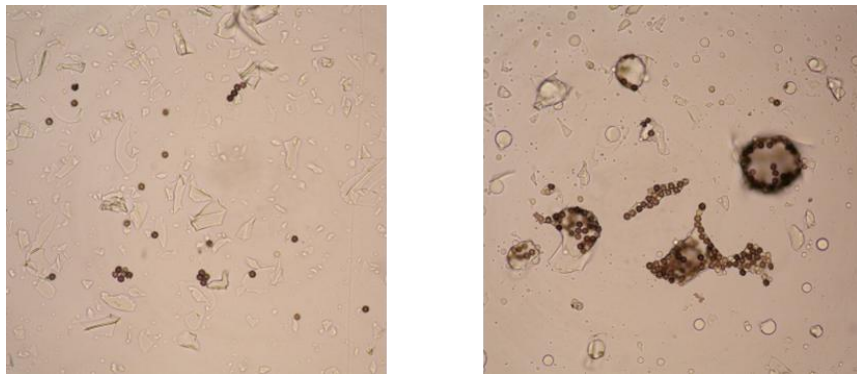


Figura 7. Esporas de *A. niger* suspendidas en solución isotónica sin HXD (izquierda) y en solución isotónica adicionada con HXD (derecha).

Con base en lo anterior, se decidió realizar un experimento adicionando HXD directo, sin hexano como disolvente. La variable fue el orden de adición de nutrientes, evaluando la concentración de biomasa y HXD con el tiempo. Se utilizó el mismo tipo de cultivo sólido, sin modificación previa con corriente eléctrica, descrito en el experimento anterior.

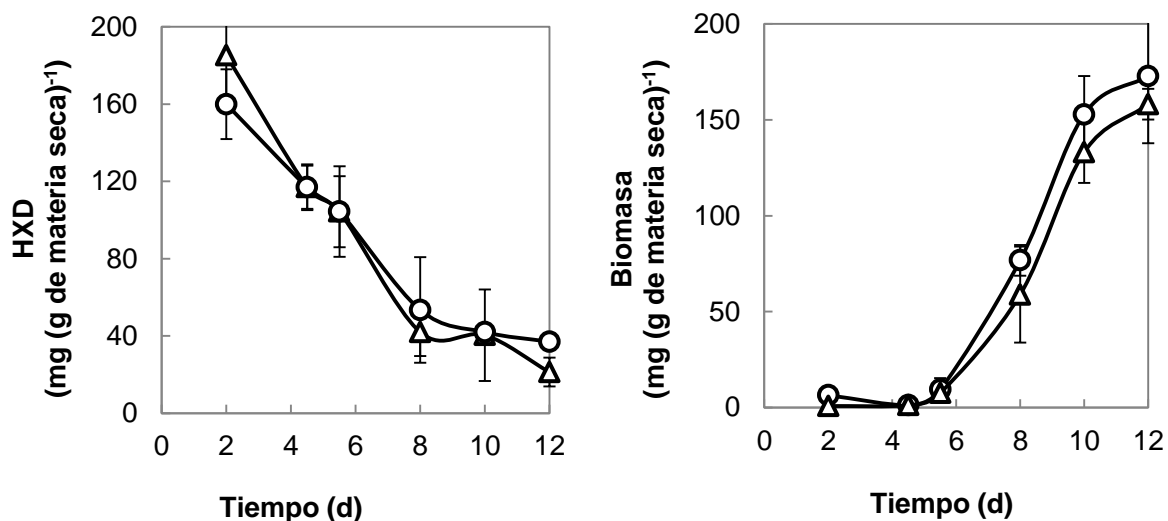


Figura 8. Efecto del orden de adición de nutrientes en cultivo sólido sin pretratamiento Consumo de HXD (izquierda) y producción de biomasa (derecha) por la biomasa de *A. niger* sin pretratamiento, adicionando HXD (directo y sin hexano como disolvente) seguido de medio acuoso (Δ) y medio acuoso seguido de HXD (○).

En la Figura 8 se observa que el orden de adición de nutrientes, es una variable que no afecta la producción de biomasa ni el consumo de HXD; es decir, el HXD y los nutrientes se pueden adicionar de manera directa y en cualquier orden, sin afectar el resultado final en la actividad de la biomasa de *A. niger*. En tanto que en el momento de la adición de nuevos nutrientes es necesario agitar para homogeneizar el medio, lo cual podría provocar algún tipo de estrés al hongo y afectar la eficiencia metabólica (Miranda y col. 2003) por lo que se decidió descartar esa posibilidad, evaluando el efecto de la agitación mecánica manual sobre la producción de biomasa y consumo de HXD.

7.1.2. Efecto de la agitación mecánica

Estudios sobre cultivos sólidos han demostrado que tienen ventajas sobre los cultivos líquidos, sobre todo, en los rendimientos y productividades para producir metabolitos de interés comercial (Singhania y col. 2010; Barrios-González, 2012); sin embargo, la manera de operar un fermentador sólido no es trivial, una variable importante en cultivos sólidos es la agitación mecánica (Manpreet y col. 2005); particularmente con hongos filamentosos, ya que puede dañar la estructura micelial y provocar algún estrés por esfuerzos mecánicos que modifique el

metabolismo (Schutyser, 2003); por ello se decidió evaluar el efecto de la agitación mecánica manual, en distintos estados fisiológicos, sobre la producción de biomasa y el consumo de HXD. En la Figura 9 se observa la producción de biomasa y consumo de HXD al cabo de 12 días de cultivo, la variable en este experimento fue el día del cultivo en que se agitó (manualmente, utilizando una espátula) y se compara con un control (sin agitación), de tal manera que es posible discernir a propósito de la susceptibilidad del hongo al posible estrés mecánico en distintos estados fisiológicos.

La Figura 9 muestra que, la agitación tiene una influencia clara en la producción de biomasa, por ejemplo: agitar al día 6 aumentó la producción de biomasa en 19% respecto al control, posiblemente una mayor homogeneidad del medio, debida al mezclado; pero disminuyó en 45% cuando el cultivo se agitó en el día 8, esto podría ser debido al rompimiento de las estructuras miceliales (Schutyser, 2003); en los experimentos anteriores, se observa que al día 8 ya hay una producción importante de biomasa, en este estado fisiológico del cultivo, el rompimiento de hifas podría tener efectos negativos sobre el crecimiento de *A. niger*.

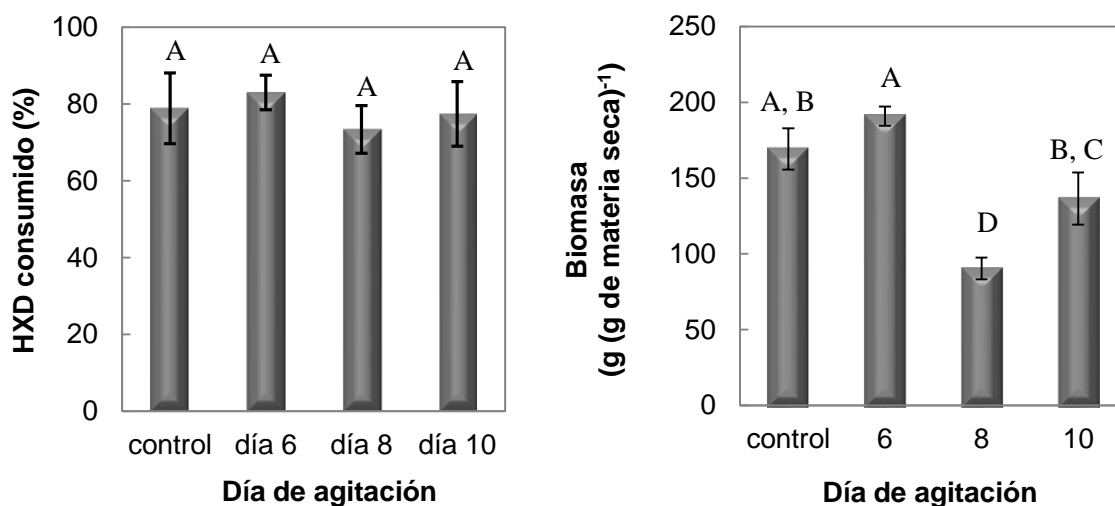


Figura 9. Efecto de la agitación mecánica manual sobre la producción de biomasa y el consumo de HXD. Se agitó en diferentes tiempos de cultivo y se dejó continuar el cultivo hasta 12 días sin agitación, las variables fueron medidas al cabo de 12 días. Análisis estadístico: Tuckey ($\alpha = 0.05$), entre letras iguales no hay diferencia significativa.

Algunos trabajos reportan que los esfuerzos mecánicos provocan cambios morfológicos o ruptura de hifas, e inhiben la producción de hifas aéreas (Schutyser, 2003). No se sabe con exactitud el papel que juegan las hifas aéreas en el metabolismo secundario; sin embargo, se ha observado que en cultivos de *A. oryzae* influyen en el consumo total de oxígeno (Rahardjo y col. 2002). Se ha observado, también, que en un cultivo de *P. crysogenum*, la producción de penicilina disminuye en 30% por efecto de agitar cada 24 h; sin embargo, encontraron que esa disminución se contrarrestaba restableciendo el agua que perdía el cultivo al ser agitado (Barrios-González y col.. 1993); es decir, aunque la agitación afecta la estructura micelial y la producción de biomasa, no necesariamente es así para la producción de metabolitos, en nuestro caso el consumo de sustrato no se vio afectado. Con base en los resultados obtenidos se decidió agitar mecánicamente, utilizando una espátula, para homogeneizar el medio sólido al momento de adicionar los nutrientes para reutilizar la biomasa producida en el primer ciclo de cultivo.

Una vez establecido que para utilizar la biomasa de *A. niger* producida en un cultivo sólido, es posible realimentar los nutrientes y la fuente de carbono directamente y agitar mecánicamente para homogeneizar el sistema sin provocar efectos sobre la capacidad de consumo de HXD; el siguiente paso fue evaluar la capacidad de consumo y producción de biomasa en un segundo ciclo de cultivo, bajo la hipótesis de que *A. niger* seguirá metabolizando al HXD.

7.1.3. Evaluación de la actividad catalítica de la biomasa reutilizada de *A. niger* en el consumo de HXD

Una vez establecida la técnica para reutilizar la biomasa de *A. niger* en el cultivo sólido, el paso siguiente fue verificar que *A. niger* seguía activo después de adicionarle HXD y nutrientes, sin la aplicación del pre-tratamiento.

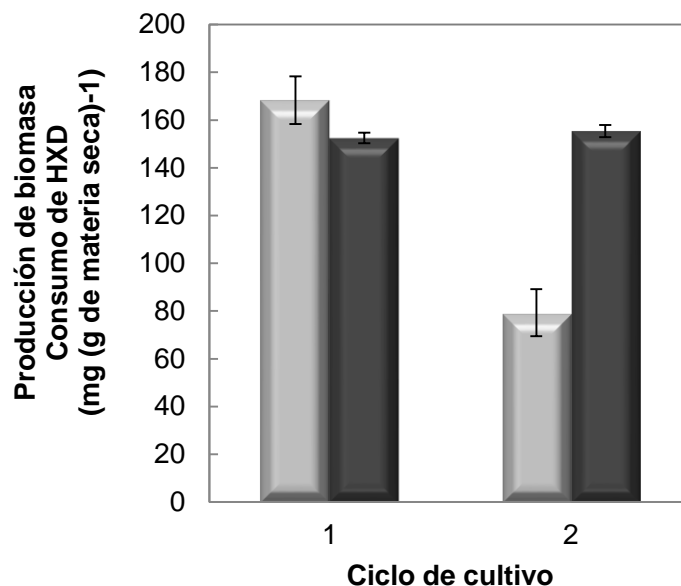


Figura 10. Reutilización de la biomasa producida en un cultivo sólido para consumir HXD en un segundo ciclo de cultivo. Producción de biomasa (acumulada para el segundo ciclo) (■) y consumo de HXD (■)

En la Figura 10 se muestra la producción de biomasa y el consumo de HXD en dos ciclos de cultivo sucesivos. En el ciclo 1 se produjeron 1.10 g de biomasa por cada g de HXD consumido, este resultado es razonable ya que la fracción de carbono en el HXD del 85%, mientras que en la biomasa es del 42% según la formula empírica que reportan Villadsen y col. (2011) para la biomasa de *A. niger*. Abbott y Clamen (1973) reportaron coeficientes de rendimiento, para bacterias creciendo a expensas de parafinas, de 1.03 g de células (g de sustrato)⁻¹, resultado similar al que se obtuvo en este trabajo. Se observó que la producción de biomasa disminuyó en 53% en el segundo ciclo respecto al primero, pero el consumo de HXD se mantuvo constante; es decir, la biomasa de *A. niger* reutilizada seguía activa, además los mg de HXD consumidos por cada mg de biomasa producida, se duplicó para el segundo ciclo de cultivo; este resultado podría ser debido a que en el primer ciclo el hongo se aclimata a las condiciones del cultivo, es decir sintetiza las enzimas necesarias; así, para el segundo cultivo es más fácil consumir al HXD. Este resultado es similar a lo que observaron Greenwood y col. (2009), donde mencionan que un cultivo previo de la microbiota de un suelo, utilizando hidrocarburos como sustratos, provoca cambios funcionales que aumentan su eficiencia de biorremediación de suelos contaminados.

Una vez aclarado que la biomasa de *A. niger* sigue activa, decidimos evaluar la actividad de la biomasa pretratada y así responder a la pregunta de si las características adquiridas, durante el pretratamiento con un campo eléctrico, seguían presentes.

7.2. Evaluación de la actividad del biocatalizador pretratado, en medio sólido

Para la evaluación de la actividad del biocatalizador pretratado se consideraron dos aspectos importantes: el consumo específico de HXD (medido como los mg de HXD que consume cada mg de biomasa) y el destino del carbono del HXD consumido.

7.2.1. Consumo específico de HXD

Con los resultados mostrados en la Figura 10, queda claro que *A. niger* sigue metabolizando HXD en un segundo ciclo de cultivo. Con el objeto de evaluar la permanencia de las modificaciones provocadas por el pretratamiento se realizó un cultivo sólido utilizando el biocatalizador (*A. niger* inmovilizado en agrolita) pretratado; en la Figura 11 se muestran la producción de biomasa y consumo de HXD por el biocatalizador en dos ciclos de cultivo sucesivos en medio sólido; el pretratamiento se aplicó durante el primer ciclo.

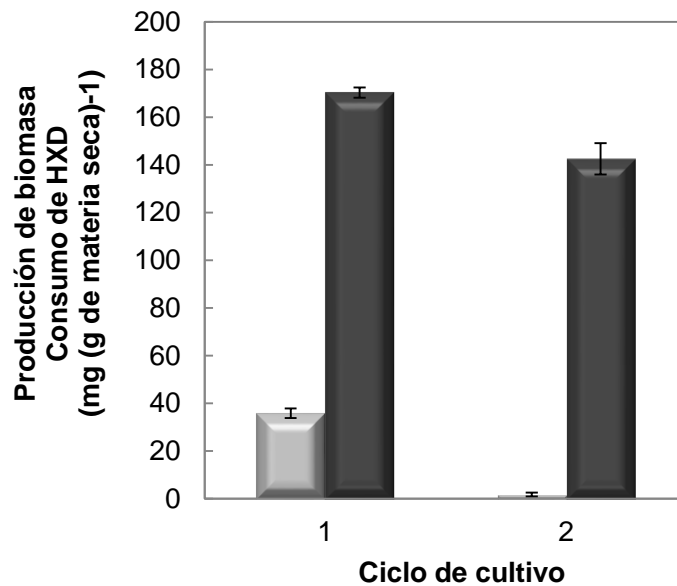


Figura 11. Reutilización del biocatalizador pretratado (en el primer ciclo) para el consumo de HXD en un segundo ciclo de cultivo. Producción de biomasa (■) y consumo de HXD (■).

En la Figura 11 se aprecia que en el ciclo de cultivo 1 (donde se aplicó el pretratamiento electroquímico) la producción de biomasa disminuyó con respecto al ciclo de cultivo 1 de la biomasa sin pretratar (control), pero el consumo de HXD aumentó de un 84% a un 96% (ver sección 7.1.3, Figura 10). Se observa que durante el segundo ciclo de cultivo, ya no hubo producción de biomasa por el biocatalizador pretratado y el consumo de HXD fue del 86%, el consumo de HXD por el biocatalizador pretratado disminuyó en el ciclo 2 respecto al ciclo 1; cabe mencionar que la biomasa contenida en el biocatalizador pretratado es 6 veces menor con respecto al control (no pretratado). Si se comparan los coeficientes de rendimiento de producción de biomasa a expensas del HXD consumido ($Y_{g\ C-X/g\ C-HXD}$, expresados como los gramos de carbono correspondientes a la biomasa producida entre los gramos de carbono correspondientes al HXD consumido), éstos son, para el biocatalizador pretratado de 0.11 y 0.007 en el primer y segundo ciclo respectivamente; mientras que el caso del control, es de 0.61 y 0.28. Los coeficientes de rendimiento para el segundo ciclo de cada caso indican que el biocatalizador pretratado consume hasta 41 veces más al HXD produciendo la misma cantidad de biomasa: 80.54 y 1.96 mg HXD consumido $(\text{mg biomasa})^{-1}$ para el biocatalizador pretratado y sin pretratar, respectivamente. El coeficiente de rendimiento para el control fue de

0.55 g C-X (g C-HXD)⁻¹ Una nueva interrogante que surgió en este punto de este trabajo es ¿dónde termina el carbono del HXD consumido por el biocatalizador?

7.2.2. Destino del carbono del HXD consumido

Una de las características adquiridas por el biocatalizador gracias al pretratamiento electroquímico es la orientación del metabolismo hacia rutas catabólicas. Para confirmar este resultado en un segundo ciclo, se realizó un cultivo, con 18 mg de HXD iniciales por g de soporte (concentración de HXD 10 veces menor para conservar condiciones aerobias), comparando la tasa de respiración del biocatalizador pretratado y sin pretratamiento, con un cultivo (cultivo sólido inoculado con 2×10^6 esporas de *A. niger* producidas en medio PDA por g de soporte seco), los resultados se muestran en la Figura 12.

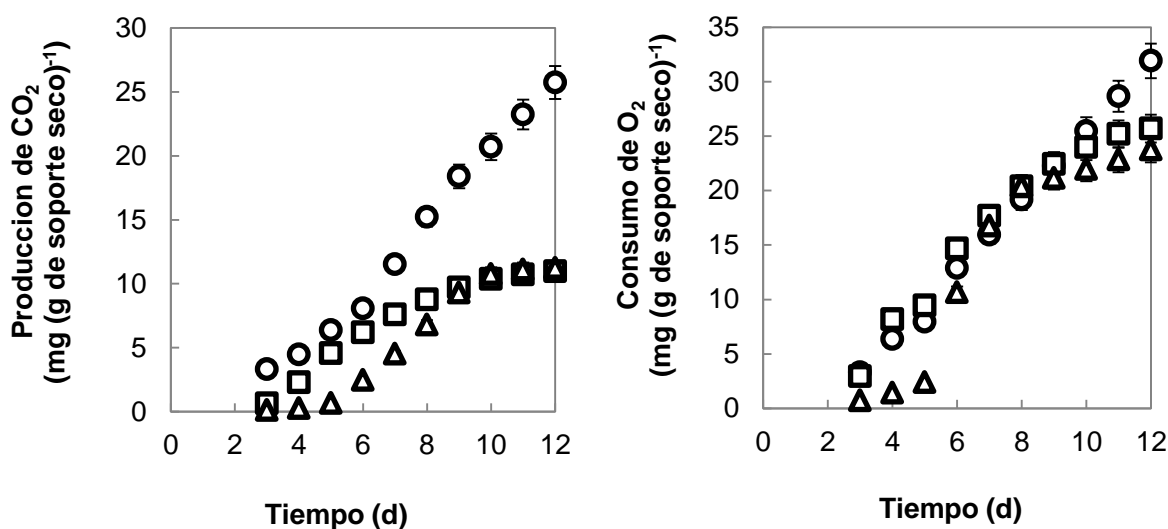


Figura 12. Producción de CO₂ y consumo de O₂ durante el consumo de HXD en medio sólido. Producción de CO₂ (izquierda) y consumo de O₂ (derecha) por el biocatalizador pretratado (○), el biocatalizador sin pretratamiento (□). Se comparan con un cultivo inoculado con esporas de *A. niger* recién producidas en PDA (Δ).

En la Figura 12 se observa que entre el biocatalizador sin pretratamiento y el control no hay diferencia en la producción de CO₂ al final del cultivo, la fase lag para el biocatalizador sin pretratamiento es 2-3 días menor que el control, esto podría ser debido a que ya se encuentra

adaptado a las condiciones del cultivo; es decir, en el cultivo inoculado con esporas debe sintetizar las enzimas necesarias para oxidar al HXD mientras que la biomasa proveniente del primer ciclo de cultivo (con HXD) ya las sintetizó, favoreciendo la oxidación de HXD (Greenwood y col. 2009).

El biocatalizador pretratado muestra una capacidad de mineralización de HXD 2.3 veces mayor que el biocatalizador sin pretratamiento (44.5% y 20% del HXD inicial, respectivamente), este resultado indica que el metabolismo sigue preferente hacia rutas catabólicas por efecto del pretratamiento electroquímico. Una fracción importante del carbono inicial no se logró cuantificar al final del cultivo, para evaluar esta fracción se realizó un balance de carbono y uno de grado de reducción, que permitió inferir sobre el destino del carbono del conjunto de metabolitos no cuantificados al final del experimento. En la Tabla 3 se muestran los coeficientes de rendimiento en términos de C-mol de carbono en los productos por C- mol de carbono proveniente del HXD consumido, el grado de reducción, agrupados en un solo compuesto (para ver los detalles de los balances ver Anexo B).

Cabe mencionar que los rendimientos de CO₂ fueron obtenidos de un cultivo con una concentración inicial de HXD 10 veces menor que los experimentos de donde se obtuvieron los rendimientos de biomasa; esto fue posible dado que los experimentos obtenidos por Volke y col. (2006), demuestran que, existe una relación lineal entre la concentración inicial de HXD y algunos parámetros como; la eficiencia de consumo de sustrato, el rendimiento de CO₂ y la fase lag. La relación lineal se demostró en un intervalo de concentración inicial de HXD desde 180 hasta 717 mg (g de soporte seco)⁻¹, y extrapolando los resultados a 18 mg de HXD (g de soporte seco)⁻¹ se comprobó la validez del análisis.

Tabla 2. Coeficientes de rendimiento en cultivo sólido. Se presentan los coeficientes para producción de biomasa (Y_{C-X}), producción de CO_2 (Y_{CO_2}), consumo de O_2 por consumo de HXD (Y_{O_2}) y producción de intermediarios (Y_{C-IM}), coeficiente respiratorio (QR) y grado de reducción de los intermediarios agrupados (γ_{IM}).

	Y_{C-X}^*	$Y_{CO_2}^*$	$Y_{O_2}^*$	QR	Y_{C-IM}^*	γ_{IM}
Ciclo 2. Biocatalizador pretratado	0.007	0.578	0.986	0.586	0.414	5.190
Ciclo 2. Biocatalizador sin pretratamiento	0.341	0.226	0.728	0.310	0.433	4.184
Ciclo 1. Sin aplicación del campo eléctrico	0.573	0.236	0.687	0.343	0.190	5.354

* Coeficientes de rendimiento expresados en C-mol del i-ésimo compuesto (producido o consumido) por cada C-mol de HXD consumido.

La Tabla 2 muestra los grados de reducción para los intermediarios no cuantificados al final del experimento. Se observa que en los tres casos fue menor que el HXD, esto indica que se acumulan metabolitos que están parcialmente oxidados, y no se transforman ni a biomasa ni se mineralizan. El coeficiente de rendimiento para intermediarios en el biocatalizador pretratado es del mismo orden que en el no pretratado, pero hay que recordar que la biomasa contenida en el biocatalizador pretratado es seis veces menor que el no pretratado; por lo que la eficiencia de mineralización específica y por tanto la actividad catalítica de *A. niger* en el consumo de HXD sigue siendo mayor por efecto del pretratamiento.

7.3. Evaluación de la actividad del biocatalizador pretratado, en medio líquido

Una vez establecido que el biocatalizador pretratado conserva el metabolismo catabólico en un segundo ciclo en medio sólido, se decidió evaluarlo en medio líquido, y estudiarlo como un biocatalizador heterogéneo. Para ello, se caracterizó de manera parcial, separando los fenómenos físicos (sorción) y las reacciones de oxidación de HXD, con el objetivo de inferir sobre la naturaleza de las modificaciones provocadas por el pretratamiento electroquímico.

7.3.1. Capacidad de sorción de HXD por el biocatalizador

En tanto que el primer paso de toda reacción catalítica heterogénea es la sorción de los reactivos, se decidió evaluar la contribución del pretratamiento electroquímico sobre la capacidad del biocatalizador en la sorción de HXD, y con esto discriminar entre la actividad superficial y la actividad metabólica. Para ello se diseñaron los siguientes experimentos de sorción; realizados en botellas serológicas con el biocatalizador suspendido en medio mineral (ML) y HXD.

7.3.1.1. Cinética de sorción de HXD

El primer paso en esta etapa fue establecer el tiempo en el que el sistema (biocatalizador suspendido en una mezcla medio mineral-HXD) alcanza el equilibrio termodinámico, mismo que fue necesario para el diseño de experimentos posteriores. Para ello se realizó un experimento comparativo para describir la cinética de sorción de HXD por el biocatalizador y el soporte, pretratados y sin pre-tratar.

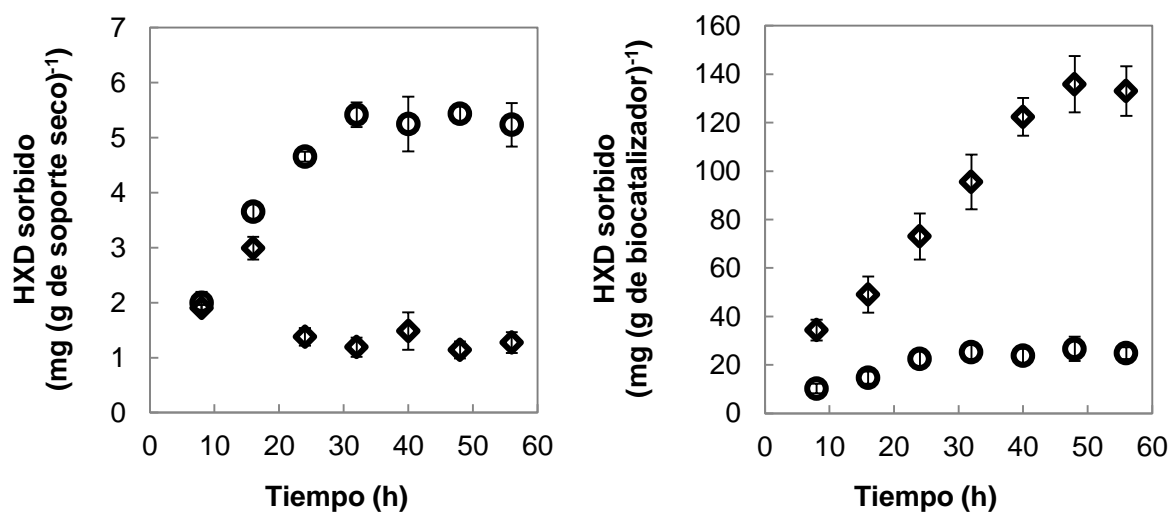


Figura 13. Cinética de sorción de HXD por el soporte (izquierda) y el biocatalizador (derecha). Sin pretratamiento (○) y después del pretratamiento (◇)

En la Figura 13 se observa que la cantidad de HXD adsorbido en la agrolita al final del experimento es limitada (5 mg de HXD por cada g de agrolita) alcanzando el equilibrio a

partir de las 30 h, y cuando se aplica el pretratamiento electroquímico, la capacidad de adsorción disminuye aún más. En el caso de *A. niger* en agrolita el equilibrio se alcanza a partir de las 24 h cuando no se aplica el pretratamiento, mientras que para el caso del biocatalizador pretratado el equilibrio se alcanzó hasta las 40 h, observándose una mayor cantidad de HXD sorbido al final del experimento por efecto del pretratamiento, 25 y 135 mg HXD por g de sólido para agrolita con *A. niger* sin pretratamiento y pretratado respectivamente. Con base en lo anterior se decidió considerar 48 h para analizar las concentraciones con certeza en el equilibrio y realizar el análisis termodinámico, mediante isotermas de sorción.

7.3.1.2. Isotermas de sorción de HXD

Mediante isotermas de sorción se describió el equilibrio termodinámico de la cantidad de HXD sorbido en el biocatalizador a temperatura constante, en función de la cantidad de HXD presente. Con estos experimentos fue posible inferir sobre la saturación del biocatalizador con HXD. En la Figura 14 se muestran los resultados para las concentraciones de HXD en las fases sólida y líquida, después de 48 h de contacto.

Se observó que la capacidad de sorción de HXD por la agrolita fue limitada (9 mg de HXD (g de agrolita)⁻¹ en la cantidad mayor de HXD ensayada), y *A. niger* vivo en agrolita sin la aplicación del pretratamiento electroquímico disminuye aún más la capacidad de sorción de HXD (5 mg (g de agrolita)⁻¹ en la cantidad mayor de HXD ensayada). Esta disminución podría deberse a que las células de *A. niger* pueden cambiar sus propiedades superficiales y pasar de hidrofóbicas (estado en el que se mantenían en el cultivo sólido del que provienen) a hidrofílicas al ponerse en contacto con en el medio acuoso, este cambio podría volver al hongo menos afín al HXD y disminuir su capacidad para sorberlo. En contraste, *A. niger* muerto con agrolita sin pretratamiento, por la inactividad metabólica, conservó las mismas propiedades hidrofóbicas que adquirió en el cultivo sólido previo; de tal manera que podría ser más afín al HXD y tener una mayor capacidad de sorción; resultados similares se obtuvieron por Chen y col. (2010) donde atribuyen una alta capacidad de sorción de hidrocarburos aromáticos

policíclicos (80 – 90% en una semana), por un consorcio de hongos de pudrición blanca, a la hidrofobicidad superficial de la biomasa. En algunos reportes se argumenta que una propiedad importante de un buen sorbente de hidrocarburos es la hidrofobicidad superficial como es el caso del carbón activado de biomasa lignocelulósica, considerado como buen sorbente de materia orgánica (Angelova y col. 2011).

Al analizar el caso del biocatalizador pretratado, se observa que las capacidades de sorción aumentan en un orden de magnitud; por una parte el biocatalizador pretratado muerto muestra una capacidad de sorción mayor que el no pretratado, alcanzando la saturación aproximadamente en 150 mg de HXD (g de soporte seco)⁻¹, y en el caso biocatalizador pretratado vivo no se observa una tendencia clara a la saturación al menos para las concentraciones de HXD ensayadas (alcanzando un máximo en HXD sorbido de 213 mg de HXD por g de biocatalizador), cabe mencionar que en este tratamiento se observó una generación excesiva de espuma en el medio líquido, lo que sugiere la producción de moléculas con capacidad surfactante, éstas podrían provenir del consumo del HXD presente.

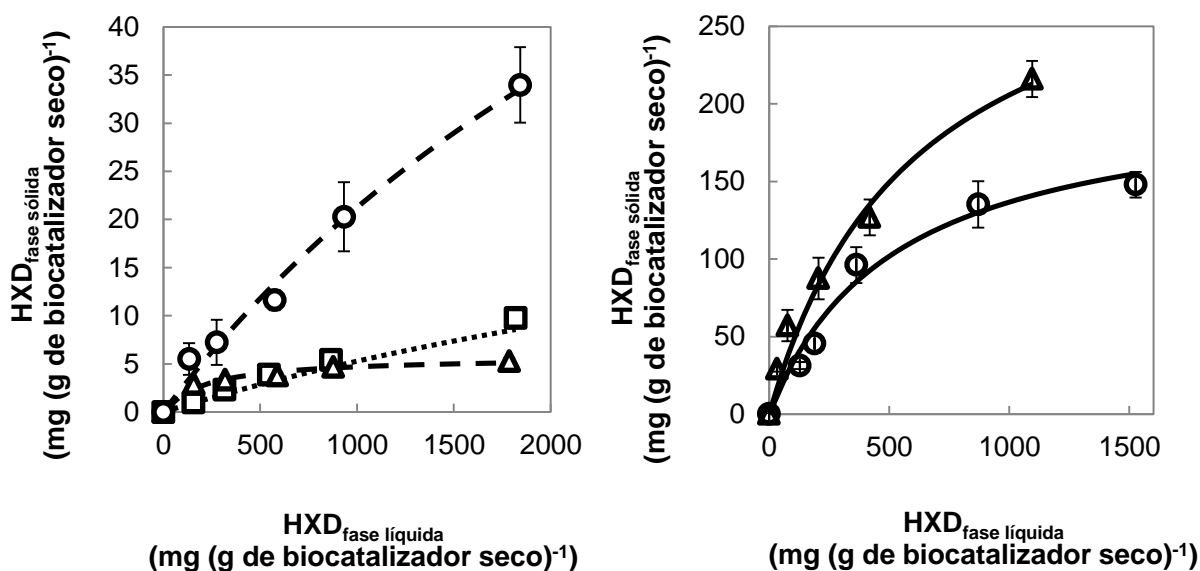


Figura 14. Isothermas de sorción de HXD por las variantes del biocatalizador sin pretratamiento (izquierda), y pretratado (derecha). Por el soporte (□), con *A. niger* vivo (Δ) y con *A. niger* muerto (○). Concentraciones expresadas con base en la masa de biocatalizador. Las isothermas fueron obtenidas al equilibrio en cada punto a 48 h, y a T = 30°C.

Si la eficiencia de sorción depende en gran medida de la hidrofobicidad del sorbente, y la hidrofobicidad del sorbente que utilizamos depende de la síntesis de hidrofobinas, que son proteínas con características surfactantes; estos resultados sugieren que el pretratamiento podría incidir e inclusive modificar la síntesis y excreción de estas proteínas, trayendo como consecuencia un aumento en la eficiencia de sorción de HXD. Además estas proteínas podrían ser termoestables o conservar la capacidad de autoensamblarse en la superficie celular de *A. niger* o en la interfase agua-HXD, facilitando la sorción de HXD, ya que después de la esterilización (biocatalizador pretratado muerto) la capacidad de sorción sigue siendo mayor. Por ejemplo, Bramanti y col. (2011) observaron que la seroalbúmina bovina, después de una desnaturalización térmica, forma pequeños agregados que modifican la tensión superficial, en el caso aquí discutido pudiera presentarse un fenómeno similar.

Como se muestra en la Figura 14, para el caso del biocatalizador pretratado vivo, no se observó una saturación evidente, a diferencia del biocatalizador pretratado muerto, este resultado sugiere que hay un fenómeno de sorción y consumo simultáneamente, para corroborar esta hipótesis se realizó un balance de materia para el HXD.

7.3.1.3. Balance de HXD

Para realizar el balance de HXD se sumó la masa de HXD sorbida y la masa de HXD dispersa en el medio mineral al final del experimento y se normalizó (dividiendo para cada caso la masa de HXD, medida y ensayada, entre la máxima cantidad de HXD adicionado al tiempo cero), de tal manera que todos los valores obtenidos para la masa de HXD quedaron entre cero y uno. Finalmente se graficaron las cantidades medidas al final contra la masa inicial para cada experimento. En la Figura 15 se muestra gráficamente el balance de HXD, en la ordenada se presenta la masa de HXD medida experimentalmente, y en la abscisa la masa inicial adicionada de HXD.

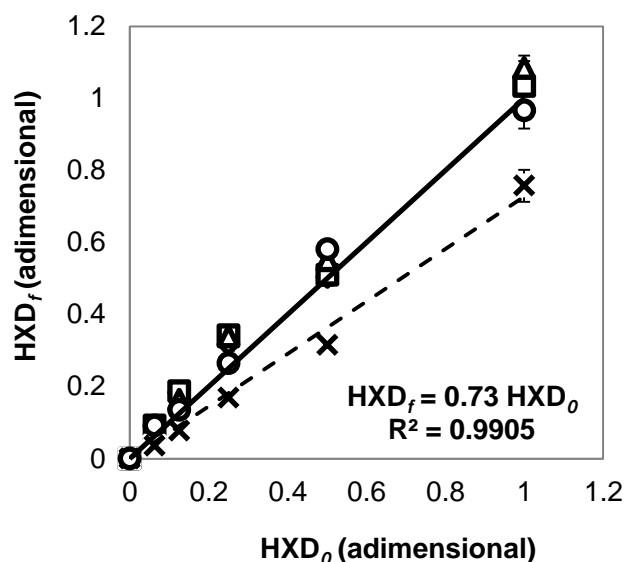


Figura 15. Balance de HXD para los experimentos de sorción. Se presenta en la abscisa el HXD medido al final del experimento y en la ordenada el HXD adicionado al inicio. Los balances se realizaron para el caso de sorción por: agrolita (\diamond), biocatalizador sin pretratamiento vivo (\square), biocatalizador sin pretratamiento muerto (\triangle), biocatalizador pretratado vivo (\times), biocatalizador pretratado muerto (\circ). Los valores se expresan escala normalizada con base en la máxima cantidad de HXD ensayada

Los resultados mostrados en la Figura 15 sugieren que en el caso del biocatalizador pretratado, parte del HXD sorbido fue metabolizado por el hongo, en este caso la pendiente de la recta ajustada ($m = 0.73$) indica que sólo se cuantificó el 73% del HXD adicionado al inicio del experimento, aparentemente el 27 % restante fue metabolizado. En el resto de los casos, se observa que la suma de las cantidades de HXD cuantificado al final del experimento corresponde con la masa inicial, masa que simplemente se distribuye en ambas fases en distintas proporciones. Previamente se realizaron análisis comparativos (cualitativos) sobre las isotermas de sorción de HXD por las diferentes variantes del biocatalizador. Para realizar una comparación cuantitativa, se ajustaron los resultados al modelo de adsorción de Langmuir (1918).

7.3.1.4. Isotermas de Langmuir

Para realizar una comparación cuantitativa de la capacidad de sorción de HXD por cada variante del biocatalizador, se ajustaron los resultados experimentales al modelo de Langmuir

(Ecuaciones 2 y 3) y se compararon los parámetros que definen las isothermas, es decir: la constante de equilibrio, constante de afinidad y la capacidad de sorción máxima, para cada variante del biocatalizador. En la Tabla 2 se presentan los valores de los parámetros generados por el modelo de Langmuir para cada tratamiento.

Recordando el modelo de Langmuir, este describe la cantidad de HXD sorbido en el biocatalizador en función del HXD que queda disperso en la fase líquida, la ecuación de la Isotherma de Langmuir es la siguiente:

$$q_A = \frac{K_e q_A^* C_A}{1 + K_e C_A}$$

O puede representarse de la siguiente manera:

$$q_A = \frac{q_A^* C_A}{K_{Af} + C_A}; \quad K_{Af} = \frac{1}{K_e}$$

Tabla 3. Parámetros del modelo de Langmuir estimados para cada variante del biocatalizador.

Variante del biocatalizador (Sistema sorbente)	K_e (x10 ⁻³ g/mg)	K_A (mg/g)	q_{HXD}^* (mg/g)
Agrolita (soporte)	0.17 ± 0.07	5780.34 ± 2312.13	35.81 ± 3.25
Biocatalizador vivo, sin pretratamiento	4.53 ± 1.31	220.75 ± 63.83	5.73 ± 1.27
Biocatalizador muerto, sin pretratamiento	0.24 ± 0.10	4032.25 ± 1612.90	106.95 ± 12.20
Biocatalizador vivo, con pretratamiento	1.65 ± 0.04	605.06 ± 14.67	330.71 ± 38.35
Biocatalizador muerto, con pretratamiento	1.92 ± 0.09	520.83 ± 24.41	208.23 ± 63.11

K_e , constante de equilibrio de sorción; K_A constante de afinidad; q_{HXD}^* capacidad máxima de sorción. Se expresa el valor obtenido para cada parámetro ± el error estándar.

En general las constantes de equilibrio (K_e) se encuentran entre 3 y 4 órdenes de magnitud con respecto a la unidad, lo que indica que la sorción tiene un grado de reversibilidad importante (Smith y col. 2005); es decir, una vez que el sólido sorbe al HXD, lo desorbe fácilmente. Al analizar los valores de las constantes de afinidad (K_A), se observa que el biocatalizador vivo sin pretratamiento (con valor más bajo) es el más afín por el HXD, seguido del biocatalizador pretratado, vivo o muerto (no hay diferencias significativa entre ambos) y tanto la agrolita como el biocatalizador muerto sin pretratamiento son los dos casos menos afines al HXD, no habiendo diferencia significativa entre ambos. Cuando se analiza la capacidad máxima de sorción (q^*_{HXD}) se observa que el biocatalizador vivo sin pretratamiento, aunque es el más afín al HXD, se satura con una menor cantidad del mismo, teniendo el valor más bajo para este parámetro; para el caso del biocatalizador pretratado, este parámetro aumenta en dos órdenes de magnitud comparando con el valor más bajo (biocatalizador vivo sin pretratamiento) y para el vivo es mayor que para el muerto.

Los valores obtenidos para los parámetros de Langmuir coinciden con los publicados por El-Naas y col. (2010); ellos utilizaron carbón activado de palma datilera para adsorber materia orgánica, el carbón activado está catalogado como buen sorbente de materia orgánica, El-Naas y col. Realizaron un análisis similar ajustando sus resultados al modelo de Langmuir, obtuvieron valores de 1.62×10^{-3} , 617.28 y 252.81 para la constante de equilibrio, constante de afinidad y la capacidad máxima de sorción respectivamente. En el caso de estudio de este trabajo, aparentemente hay consumo de HXD además de una buena capacidad de sorción, por esta razón se decidió realizar un balance de materia para el HXD.

Cabe mencionar que en los casos en que se utilizó el biocatalizador vivo, no se cumplen los postulados del modelo de adsorción de Langmuir, ya que el HXD sorbido, puede difundir hacia el interior de la biomasa y ser metabolizado por *A. niger*; en consecuencia, no es válido hacer una estimación de los parámetros para estos casos, sin embargo, son útiles para fines de comparación para evaluar si la presencia de actividad metabólica influye en la capacidad de sorción de HXD, como fue en el biocatalizador pretratado.

Finalmente, se realizó una prueba de comparación entre la capacidad máxima de sorción, normalizada con respecto al valor más bajo obtenido, es decir el biocatalizador vivo no pretratado, ($q^*_{HXD-i} / q^*_{HXD-menor}$) ver Figura 16, el cálculo se realizó también con base en la biomasa, este resultado permitió visualizar cuántas veces es mejor la biomasa para sorber HXD por efecto del pretratamiento.

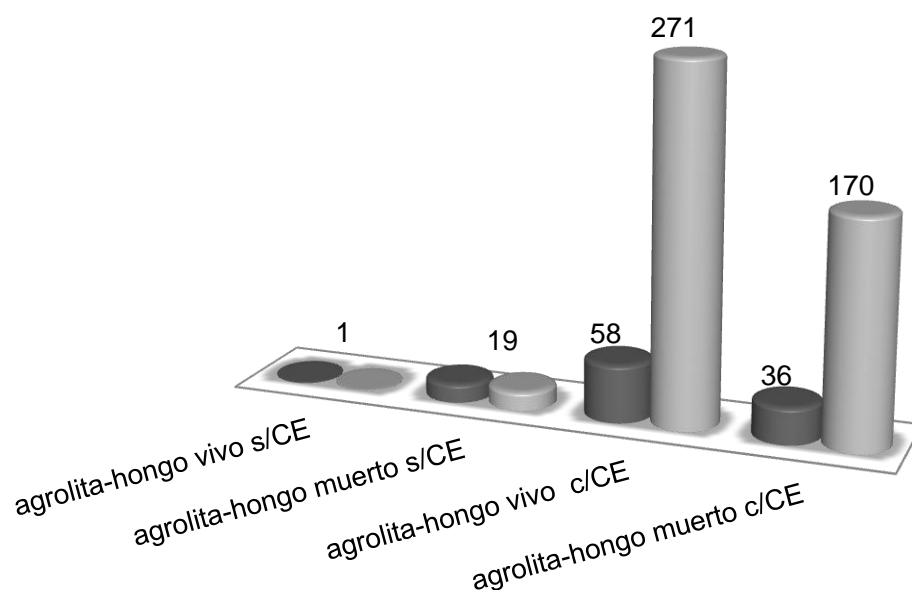


Figura 16. Comparaciones de los valores obtenidos para la capacidad máxima de sorción con base en la masa de agrolita-biomasa (■) y con base en la biomasa (▣).

Se puede apreciar que, la eficiencia de sorción aumenta casi 60 veces, con base en la masa total de sólido; pero el aumento en la eficiencia con base en la biomasa (que es la parte activa del biocatalizador en la sorción de HXD), aumenta en dos órdenes de magnitud (271 veces por efecto del pretratamiento), este comportamiento está relacionado con la magnitud de las modificaciones provocadas por la aplicación del pretratamiento electroquímico. Los cambios observados en las propiedades del medio acuoso, por ejemplo, la producción de espuma, sugieren que el biocatalizador sigue metabólicamente activo al pasar al medio líquido. Para comprobar nuestra hipótesis, y evaluar la magnitud de la actividad metabólica, se realizó el siguiente experimento de consumo de HXD en medio líquido.

7.3.2. Consumo de HXD en medio líquido

Finalmente se decidió evaluar la actividad del biocatalizador en el consumo de HXD en medio líquido. Se realizaron cinéticas de consumo utilizando el biocatalizador pretratado comparando siempre con el control (biocatalizador no pretratado). Con la hipótesis de la producción de algún tipo de proteínas que eran las responsables de la actividad surfactante observada, en ambos casos, se determinó la proteína soluble producida en el medio de cultivo libre de células. En la Figura 17 se muestran las concentraciones de HXD y proteína soluble en el medio.

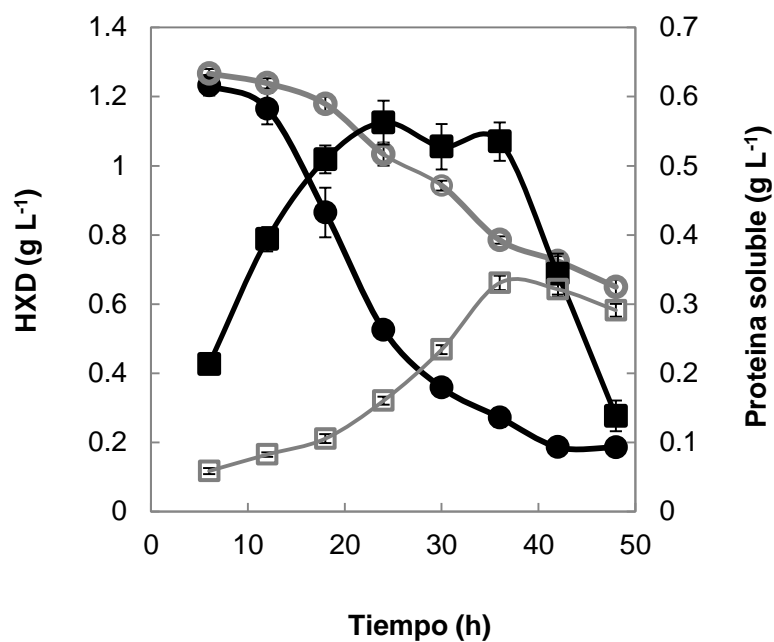


Figura 17. Cinética de consumo de HXD por el biocatalizador. Se muestra la concentración de HXD; utilizando el biocatalizador pretratado (●) y no pretratado (○); y la concentración de proteína soluble en el medio a través del tiempo usando el biocatalizador pretratado (■) y no pretratado (□).

Para el caso del biocatalizador sin pretratamiento (control), en 48 h se consumió el 53 % del HXD inicial ($0.81 \text{ mg de HXD (mg de biomasa)}^{-1}$), con una tasa de consumo promedio de $0.34 \text{ g (L d)}^{-1}$. Se encontró proteína soluble en el medio en concentraciones que alcanzaron 0.33 g L^{-1} en 36 h. A partir de ese tiempo, la concentración de proteína comenzó a disminuir,

posiblemente hubo un consumo simultáneo de HXD y la proteína detectada. Para el caso del biocatalizador pretratado, en 42 h de cultivo, se consume el 86% del HXD inicial (6.23 mg de HXD (mg de biomasa)⁻¹), con una tasa promedio de consumo de 0.55 g_{HXD} (L d)⁻¹; aunque la tasa de consumo antes del tiempo 12 fue muy baja (0.052g_{HXD} (L d)⁻¹); posteriormente se observó el consumo de HXD prácticamente en 30 horas. Al mismo tiempo en que la tasa de consumo de HXD aumentó, se observó la formación de una emulsión (ver Figura 18 A) y la concentración de proteína soluble fue mayor (0.5 g L⁻¹ al tiempo 18 h). A partir de las 36 h de cultivo, la concentración de proteína y la tasa de consumo de HXD disminuyen. Aparentemente la proteína sirve como emulsificante, ya que al tiempo en que la concentración de proteína alcanzó valores a partir de 0.5 g L⁻¹, se interrumpió la agitación y se observó una pseudofase emulsificada (ver Figura 18 A), esto podría ser el mecanismo que sigue el biocatalizador en el consumo de HXD; a partir de las 40 h, la emulsión se desestabiliza y la tasa consumo de HXD cesa, posiblemente debido a un consumo de la proteína soluble detectada. Algunas proteínas tienen la capacidad de adsorberse en las interfases líquido-líquido, por ejemplo: agua-HXD; este fenómeno está relacionado con cambios conformacionales de las proteínas y un reacomodo de cargas eléctricas que pueden incluso afectar el pH. Cuando el pH del medio se acerca al punto isoeléctrico (pI) de las proteínas se favorece la adsorción; la tensión superficial del medio no se modifica a menos que haya concentraciones superficiales de proteína elevadas en la interfase (Wierenga y Gruppen, 2010), en nuestro caso se mantuvo en 71.3 dina cm⁻¹. Si este fenómeno sucedió en nuestros experimentos, el pI de las proteínas producidas debería ser alcalino, en el momento de observarse la formación de una emulsión el pH del medio era 7.5. Al final del cultivo el pH fue 8.5, este último incremento podría ser debido a la producción de amonio por el consumo de la proteína. En tanto que la alcalinidad del medio podría provocar autólisis de la biomasa fúngica (Gibbs y col. 2000), se decidió evaluar la biomasa contenida en el biocatalizador, al inicio y al final del cultivo líquido. Se observó una pérdida del 30 % tanto en el biocatalizador pretratado como en el no pretratado, este resultado sugiere que la pérdida de biomasa podría ser más por desprendimiento de hifas debido a la agitación que por autólisis.

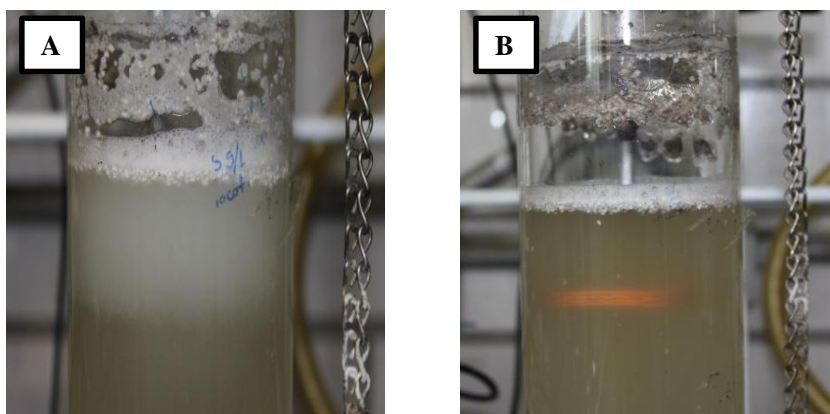


Figura 18. Emulsión formada por HXD en el medio mineral asistida por la proteína soluble en medio líquido. Utilizando el biocatalizador pretratado (A) y no pretratado (B). Imágenes tomadas al tiempo 18 h de cultivo.

Con base en los resultados obtenidos, surge la hipótesis de que el mecanismo que sigue el biocatalizador para consumir HXD en medios acuosos es asistido por un fenómeno de emulsificación, probablemente asociado a la adsorción de proteínas en la interfase agua-HXD. Aparentemente *A. niger* exporta proteínas solubles al medio, que se comportan como biosurfactantes formando una emulsión estable, con esto logra aumentar la biodisponibilidad del HXD. Sería interesante en trabajos futuros, partir de esta hipótesis para analizar el papel que juegan las proteínas exportadas al medio.

8. CONCLUSIONES

Se estandarizó el método de reutilización de biomasa de *A. niger* en cultivo sólido, sin la aplicación del pretratamiento. El HXD y medio mineral se pueden adicionar en los cultivos posteriores de manera directa, sin importar el orden de adición, homogeneizando el sistema con agitación mecánica manual utilizando una espátula cuidando no dañar la estructura del biocatalizador. Esto no afecta la actividad de la biomasa de *A. niger* en el consumo de HXD.

La utilización del biocatalizador previamente activado con un pretratamiento electroquímico se puede realizar en medio sólido, siendo 7.2 veces más eficiente en el consumo de HXD y mostrando una capacidad de mineralización 2.3 veces mayor que el no pretratado.

El pretratamiento electroquímico provoca modificaciones superficiales en el biocatalizador, aumentando en dos ordenes de magnitud la capacidad máxima de sorción de HXD por la biomasa de *A. niger*.

El biocatalizador pretratado se puede utilizar para consumir HXD en medio líquido, siendo 7.7 veces más eficiente que el no pretratado.

El metabolismo de *A. niger* se modifica, por efecto del pretratamiento electroquímico, de tal manera que el consumo de HXD en medio líquido por el biocatalizador pretratado, se asocia a la formación de una emulsión que coincide con una mayor formación proteínas solubles exportadas al medio.

9. PERSPECTIVAS

En medio líquido, se exportan proteínas que forman una emulsión estable, por efecto del pretratamiento; habría que identificar las proteínas sintetizadas y comparar con el control (sin pretratamiento). Si se exportan las mismas proteínas en mayor cantidad, el pretratamiento podría favorecer ciertas rutas de secreción así como de regulación de síntesis de estas proteínas. Si las proteínas exportadas al medio son diferentes, entonces estaríamos tratando un problema relacionado con el encendido y apagado de algunos genes.

Muchos trabajos reportan que el rendimiento para síntesis de proteínas es mayor en medio sólido que en líquido, se podría evaluar la productividad de la síntesis de proteínas por el biocatalizador pretratado en medio sólido y comparar con el líquido.

Una cuestión presente es la reproducibilidad de los efectos provocados por el pretratamiento pero utilizando otros hidrocarburos como sustratos, sería interesante evaluar los aspectos del presente trabajo pero utilizando otros hidrocarburos, por ejemplo: hidrocarburos aromáticos policíclicos o alguna carga de petróleo, como diesel.

Se demostró que en medio líquido aumenta la actividad catalítica 15 veces por efecto del pretratamiento electroquímico; sería interesante evaluar la actividad del biocatalizador en medio líquido, con concentraciones elevadas de sales y evaluar la posibilidad de aplicarlo en aguas marinas.

Una característica importante de las modificaciones provocadas por el pretratamiento electroquímico, y que no se evaluó en este trabajo, es la heredabilidad. Sería interesante evaluar las variaciones genotípicas asociadas al pretratamiento, evaluando la actividad catalítica en el consumo de HXD con las generaciones posteriores al micelio pretratado.

La metodología seguida para la aplicación del pretratamiento, no ha sido optimizada en cuanto al tiempo de aplicación de la corriente eléctrica y el tiempo de cultivo (menor a 12 días), sería interesante trabajar en la optimización de la aplicación del pretratamiento electroquímico.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott J. M. y Clamen A. (1973). The relationship of substrate, growth rate, and maintenance coefficient to single cell protein production. *Biotechnology & Bioengineering*. 15 (1), 117-127.
- Acuña-Argüelles M.E., Gutiérrez-Rojas M., Viniegra-González G. y Favela-Torres E. (1995). Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology & Biotechnology*. 43, 808–14.
- Angelova D., Uzunov I., Uzunova S., Gigova A. y Minchev L. (2011). Kinetics of oil and oil products adsorption by carbonized rice husks. *Chemical Engineering Journal*. 172, 306-311.
- Aronsson K., Lindgren M., Johansson B. R. y Rönner U. (2001). Inactivation of microorganisms using pulsed electric fields: the influence of process parameters on *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2, 41 – 54.
- Askolin S., Linder M., Scholtmeijer K., Tenkanen M., Penttilä M., de Vocht M. L. y Wösten H. A. B. (2006). Interaction and comparison of a class I hydrophobin from *Schizophyllum commune* and class II hydrophobin of *Trichoderma reesei*. *Biomacromolecules*. 7, 1295-1301.
- Barrios-González J y Mejía A. (1996) Secondary metabolites production by solid state fermentation. *Biotechnology Annual Review*. 2, 85–121.
- Barrios-González J, González H. y Mejía A. (1993). Effect of particle size, packing density and agitation on penicillin production in solid-state fermentation. *Biotechnology Advances*. 11, 539–47.

- Barrios-González J. (2012) Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochemistry*. 47, 175 – 185.
- Bramanti E., Ferrati C., Angeli V., Onor M. y Synovec R. E. (2011). Characterization of BSA unfolding and aggregation using a single-capillary viscometer and dynamic surface tension detector. *Talanta*. 85, 2553-2561.
- Carberry J. (1976). Chemical and Catalytic Reaction Engineering (Carberry J.). McGraw-Hill: 357-457.
- Chen B., Wang Y. y Hu D. (2010). Biosorption and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous solutions by a consortium of white-rot fungi. *Journal of Hazardous Materials*. 179, 845-851.
- Cox P. W. y Hooley P. (2009). Hydrophobins: New prospects for biotechnology. *British Mycological Society*. 23, 40-47.
- Cunha F. M., Esperança M. N., Zangirolami T. C., Badino A. C. y Farinas C. S. (2012). Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulose. *Bioresource Technology*. 112, 270 – 274.
- Gan S., Lau E. V. y Ng H. K. (2009). Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials*. 172, 532 – 549.
- Gervains P. y Molin P. (2003). The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 13, 85-101.
- Gibbs P. A., Seviour R. J. y Schmid F. (2000). Growth of filamentous fungi in submerged culture: Problems and possible solutions. *Critical Reviews in Biotechnology*. 20 (1), 17-48.
- Ho S. V., Athmer C., Sheridan P. W., Hughes B. M., Orth R., McKenzie D., *et al.* (1999). The Lasagna technology for in situ soil remediation. 1. Small field test. *Environmental Science & Technology*. 33 (7), 1086-1091.

- Holladay D. W., Hancher C. W., Scott C. D. y Chilcote D. D. (1978). Biodegradation of phenolic waste liquors in stirred-tank, packed-bed, and fluidized-bed bioreactors. *Water pollution Control Federation*. 50 (11), 2573 – 2589.
- Khan F. I., Husain T. y Hejazi R. (2004). An overview and analysis of the site remediation technologies. *Journal of Environmental Management*. 71, 95-122.
- Langmuir I. (1916). The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part I. Solids. *Journal of the American Chemical Society*. 38, (11), 2221 – 2295.
- Langmuir I. (1917). The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. *Journal of American Chemical Society*. 39, (9), 1848 – 1906.
- Langmuir I. (1918). The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *Journal of American Chemical Society*. 40, (9), 1361 – 1403.
- Lear G., Harbottle M., van der Gast C., Jackman S., Knowles C., Sills G., *et al.* (2004). The effect of electrokinetics on soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry*. 36, 1751-1760.
- Lehka P. K. y Lonsane B. K. (1994). Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by PKL 104 in solid-state and submerged cultures. *Process Biochemistry*. 29, 497–503
- Levenberg K. (1944). A Method for the Solution of Certain Non-Linear Problems in Least Squares. *The Quarterly of Applied Mathematics* 2: 164–168.
- Littlejohn K. A., Hooley P. y Cox P. W. (2012). Bioinformatics predicts diverse *Aspergillus* hydrophobins with novel properties. *Food Hydrocolloids*. 27 (2), 503-516.
- Lizardi-Jimenez M. A., Saucedo-Castañeda G., Thalasso F. y Gutiérrez-Rojas M. (2012). Simultaneous hexadecane and oxygen transfer rate on the production of an oil-degrading consortium in a three-phase airlift bioreactor. *Chemical Engineering Journal*. 187 160-165.

- Mancera-López M. E., Esparza-García F., Chávez-Gómez B., Rodríguez-Vázquez R., Saucedo-Castañeda G. y Barrera-Cortés J. (2008). Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with filamentous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 61, 151 – 160.
- Manpreet S., Sawraj S., Sachin D., Pankaj S. y Banerjee, U. C. (2005). Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*. 1 (2), 1–9.
- Miranda L.O., Tomasini A., Mejía A. y Barrios-González J. (2003). Efecto del mezclado y la adición de agua y lactosa en la producción de penicilina por *Penicillium chrysogenum*, en fermentación en estado sólido, usando un biorreactor dinámico. *Revista Internacional Información Tecnológica*. 14 (1), 125 – 130.
- Mowla D. y Ahmadi M. (2007). Theoretical and experimental investigation of biodegradation of hydrocarbon polluted water in a three phase fluidized-bed bioreactor with PVC biofilm support. *Biochemical Engineering Journal*. 36, 147-156.
- Obueqwe C. O., Al-Jadi Z. K. y Al-Sale E. S. (2009). Hydrocarbon degradation in relation to cell-surface hydrophobicity among bacterial hydrocarbon degraders from petroleum-contaminated Kuwait desert environment. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 63, 273-279.
- Pao S. S., Paulsen I. T. y Saier M. H. (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64, 1 – 32.
- Petróleos Mexicanos, Anuario estadístico 2011.
- Pieper D. H. y Reineke W. (2000). Engineering bacteria for bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*. 11, 262 – 270.
- Procuraduría Federal de Protección al Ambiente. (2002).

- Rahardjo Y. S. P., Weber F. J., le Comte E. P., Tramper J. y Rinzema A. (2002). Contribution of aerial hyphae of *Aspergillus oryzae* to respiration in a model solid-state fermentation system. *Biotechnology & Bioengineering*. 78, 539 – 44.
- Romantschuk M., Sarand I., Petänen T., Peltola L., Jonsson-Vihanne M., Koivula T., *et al.* (2000). Means to improve the effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches. *Environmental Pollution*. 107, 179-185.
- Schutyser A. I. 2003. Mixed solid-state fermentation: numerical modeling and experimental validation. Ph.D. Thesis, Wageningen University, The Netherlands. ISBN: 90-5808-848-O.
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2010).
- Seong-Hye K., Hyo-Yeol H., You-Jin L., Chul W. K. y Ji-Won Y. (2010). Effect of electrokinetic remediation on indigenous microbial activity and community within diesel contaminated soil. *Science of the Total Environment*. 408, 3162-3168.
- Singhania R. R., Sukumaran R. K. y Patel A. K., (2010). Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*. 46, 541–549.
- Smith J. M., Van Ness H. C. y Abbott M.M. (2005). Introducción a la termodinámica en Ingeniería Química (Smith J. M., Van Ness H. C. y Abbott M.M.). McGraw-Hill. 483-529.
- Smith J. M. (1986). Ingeniería de la Cinética Química (J. M. Smith). McGraw-Hill. 351-378.
- Sokól W. (2003). Treatment of refinery wastewater in a three-phase fluidised bed bioreactor with a low density biomass support. *Biochemical Engineering Journal*. 15, 1-10.
- Solano-Serena F., Marchall R., Blanchet D. y Vandecasteele, J. (1998). Intrinsic capacities of soil microflora for gasoline degradation. *Biodegradation*. 9, 319-326.
- Stroud J. L., Paton G. I. y Semple K. T. (2009). The effect of agitation on the biodegradation of hydrocarbon contaminants in soil slurries. *Chemosphere*. 77, 123-128.

- Sunde M., Kwan H. Y., Templeton M. D., Beever R. E. y Mackay J. P. (2008). Structural analysis of hydrophobins. *Review. Micron*. 39, 773-784.
- Tessie J., Golzio M. y Rols M. P. (2005). Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: A minireview of our present (lack of ?) knowledge. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1724, 270 – 280.
- Thrash J. C. y Coates J., D. (2008). Review: direct and indirect electrical stimulation of microbial metabolism. *Environment Science Technology*. 42 (11), 3921-3931.
- Tzintzun-Camacho O., Loera O., Ramírez-Saad H. C. y Gutiérrez Rojas M. (2012). Comparison of mechanisms of hexadecane uptake among pure and mixed cultures derived from a bacterial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 70, 1-7.
- Velasco-Alvarez, N., González, I., Damian-Matsumura, P. y Gutiérrez-Rojas, M. (2011). Enhanced hexadecane degradation and low biomass production by *Aspergillus niger* exposed to an electric current in a model system. *Bioresource Technology*. 102, 1509-1515.
- Vieira P. A., Vieira R. B., Faria S. y Cardoso V. L. (2009). Biodegradation of diesel oil and gasoline contaminated effluent employing intermittent aeration. *Journal of Hazardous Materials*. 168, 1366-1372.
- Villadsen J., Nielsen J. y Liden G. (2011). *Bioreaction Engineering Principles*, 3° Ed. (Villadsen J., Nielsen J. y Liden G). Springer. 63-117.
- Virkutyte J., Sillampää M. y Latostenmaa, P. (2002). Electrokinetic soil remediation-critical overview. *The Science of the Total Environment*. 289, 97-121.
- Volke-Sepulveda T. y Velasco J. A. (2002). *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. México: INE-SEMARNAT.
- Volke-Sepúlveda T. L., Gutiérrez-Rojas M. y Favela-Torres, E. (2003). Biodegradation of hexadecane in liquid and solid-state fermentations by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*. 87, 81-86.

- Volke-Sepúlveda T., Gutiérrez-Rojas M. y Favela-Torres E. (2006). Biodegradation of high concentrations of hexadecane by *Aspergillus niger* in a solid-state system: Kinetic analysis. *Bioresource Technology*. 97, 1583-1591.
- Wang X., Graveland-Bikker J. F., De Kruif C. G. y Robillard G. T. (2004). Oligomerization of hydrophobin SC3 in solution: from soluble state to self-assembly. *Protein Science*. 13, 810-821.
- Wang X., Shi F., Wösten H. A. B., Hektor H., Poolman B. y Robillard G. T. (2005). The SC3 Hydrophobin Self-Assembles into a Membrane with Distinct Mass Transfer Properties. *Biophysical Journal*. 88, 3434-3443.
- Wick L. Y., Buchholz F., Fetzer I., Kleinstauber S., Härting C., Shi L., *et al.* (2010). Responses of soil microbial communities to weak electric fields. *Science of the Total Environment*. 408, 4886-4893.
- Wick L. Y., Shi L. y Harms , H. (2007). Electro-bioremediation of hydrophobic organic soil-contaminants: A review of fundamental interactions. *Electrochimica Acta*. 52, 3441-3448.
- Wierenga P. A. y Gruppen H. (2010). New views on foams from protein solutions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15, 365–373
- Zarooni M. A., y Elshorbagy W. (2006). Characterization and assessment of Al Ruwais refinery wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 398-405.

Anexo A. Curva estándar para cuantificación de biomasa

A continuación se muestra la curva estándar de biomasa de *A. niger* contenida en la agrolita. En tanto que la biomasa se determina por un método espectrofotométrico, y las esporas tiñen el medio en el que se hidroliza la biomasa, se realizaron dos curvas independientes: una para micelio únicamente, y la otra para micelio con esporas, observando una absorbancia 10% mayor para el caso de micelio con esporas; por lo tanto, se utilizaron las dos curvas dependiendo del estado fisiológico del micelio, es decir si había producido esporas o no.

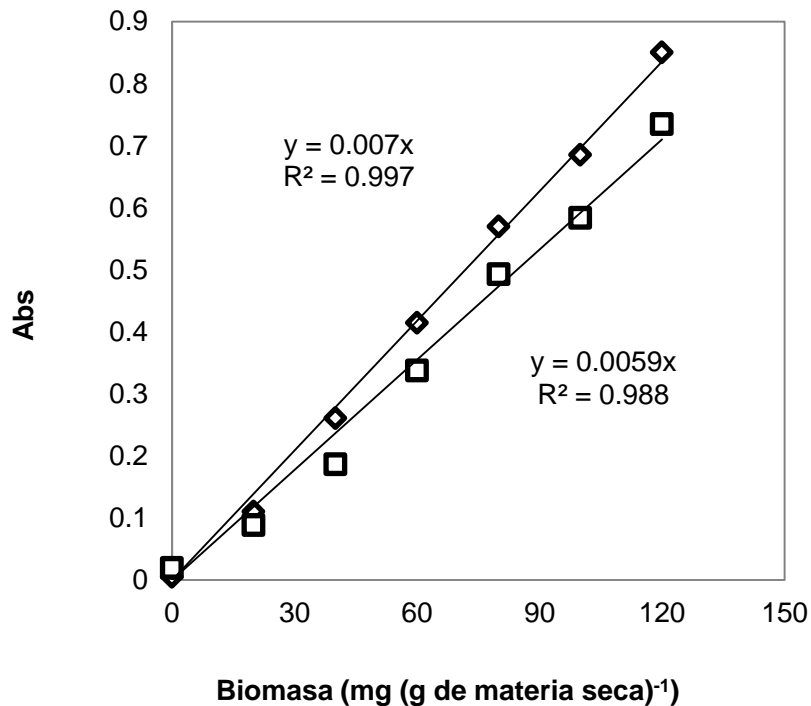
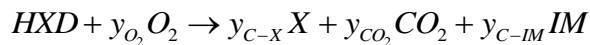


Figura 19. Curva estándar de biomasa contenida en la agrolita. Se cuantificó la proteína para micelio (◻) y para micelio con esporas (◆).

Anexo B. Balances de Carbono y grado de reducción en cultivo sólido.

El balance de carbono se realizó con el objetivo de conocer la fracción de carbono que se queda como intermediarios en el metabolismo de *A. niger*, y que no se logró cuantificar al final de los cultivos sólidos. El balance de grado de reducción nos da un indicio del grado de oxidación de los metabolitos intermediarios. Para el balance de carbono se consideró la siguiente reacción química:



Donde X representa la biomasa de *A. niger*, IM representa a los metabolitos intermediarios que no fueron cuantificados al final del cultivo, agrupados en un solo termino, los coeficientes y_i son los coeficientes de rendimiento expresados en términos de los C-mol del i-ésimo compuesto, producido o consumido, por cada C-mol de HXD consumido. El balance de grado de reducción resulta en la siguiente ecuación:

$$\gamma_{HXD} + y_{O_2} \gamma_{O_2} - y_{C-X} \gamma_X - y_{C-IM} \gamma_{IM} = 0$$

Los balances de carbono y grado de reducción resultan en el siguiente sistema de ecuaciones lineales.

$$y_{C-IM} = 1 - y_{C-X} - y_{CO_2}$$
$$\gamma_{IM} = \frac{\gamma_{HXD} + y_{O_2} \gamma_{O_2} - y_{C-X} \gamma_X}{y_{C-IM}}$$

Donde: γ_{IM} es el grado de reducción de los metabolitos agrupados en un solo compuesto denominado intermediario (IM).

Los coeficientes de rendimiento están expresados en C-mol de cada producto por C mol de HXD consumido.

Los grados de reducción se consideraron por C mol de cada compuesto:

$$\gamma_{HXD} = 6.125$$

$$\gamma_X = 4.11$$

$$\gamma_{O_2} = -4$$