

**IPICYT**

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS APLICADAS**

**Oxidación anaerobia de hidrocarburos acoplada a  
la reducción de sustancias húmicas**

Tesis que presenta

**Ana Rosa Mancilla Delgadillo**

Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias Aplicadas**

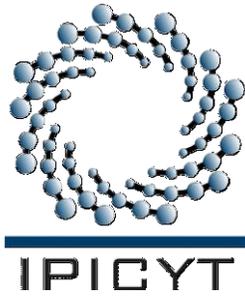
En la opción de

**Ciencias Ambientales**

Director de la Tesis:

**Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo**

**San Luis Potosí, S.L.P., 29 de Mayo de 2010**



## CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE TESIS

La tesis “**Oxidación anaerobia de hidrocarburos acoplada a la reducción de sustancias humicas**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Aplicadas en la opción de Ciencias Ambientales fue elaborada por **Ana Rosa Mancilla Delgadillo** y aprobada el **29 de mayo de 2010** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

---

Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo  
(Director de la tesis)

---

Dr. Elías Razo Flores  
Asesor de la tesis

---

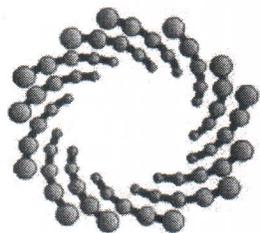
Dra. Sonia Lorena Arriaga García  
Asesora de la tesis



## **CRÉDITOS INSTITUCIONALES**

Esta tesis fue realizada en los laboratorios de Ingeniería y Biotecnología Ambiental, Análisis Instrumental, y Ecología y Cambio Global de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (211825) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. Este trabajo fue financiado por el proyecto SEP-CONACYT-55045.



**IPICYT**

# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 036 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Aplicadas en la opción de Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 9 días del mes de junio del año 2010, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Elías Razo Flores</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Sonia Lorena Arriaga García</b>	<b>Secretaria</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Frédéric Thalasso</b>	<b>Sinodal externo</b>	<b>CINVESTAV</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS APLICADAS  
EN LA OPCIÓN DE CIENCIAS AMBIENTALES**

sustenta la C.

**Ana Rosa Mancilla Delgadillo**

sobre la Tesis intitulada:

*Oxidación anaerobia de hidrocarburos acoplada a la reducción de sustancias húmicas*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dandose por terminado el acto a las 17:45 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 9 días del mes de junio de 2010.

*Marcial Bonilla Marín*

**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



*Ivonne Ligette Cuevas Vélez*

**Mtra. Ivonne Ligette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

## **DEDICATORIA**

A mis padres que siempre me han dado la libertad de abrir las alas, y volar hacia nuevos horizontes, por su amor y comprensión.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo por todo lo que aprendí formando parte de su grupo de trabajo, por su paciencia y el tiempo dedicado, pero sobre todo por la confianza brindada; al Dr. Elías Razo Flores y la Dra. Sonia Lorena Arriaga García, por impulsarme a dar lo mejor de mí, así como por sus consejos académicos y personales; al Dr. Frederic Thalasso, por sus valiosos comentarios.

A la Dra. Silvia Ceballos y al Dr. Roberto Muñoz, por la ayuda brindada en el desarrollo de métodos; a la M.C. Dulce Partida y el M.C. Guillermo Vidriales, por todo el apoyo para la realización de los experimentos, a mis compañeros de equipo Jorge González y Luis H. Álvarez, por su continua ayuda en el laboratorio y a la Dra. Berenice Celis, por resolverme cantidad de dudas.

A Angélica, Ivonne, Edith y Gerson por todo el apoyo brindado en asuntos administrativos.

A mis mejores amigos Maye y Jorge, por su apoyo en los momentos felices, pero sobre todo por haber estado conmigo en los momentos más difíciles de mi vida; a Harold, Rox, Silvia, Roberto, Cesar, Kitzi, Pedro, David, Luis y Luis Carrillo, por brindarme su amistad y su cariño y compartir momentos muy gratos e inolvidables durante mi estancia en San Luis Potosí; a la Sra. Sofía por ser como una segunda madre y por abrirme las puertas de su casa; a mi familia, tíos, primos, particularmente a mi Abuelita, por su cariño, y a mis tías Elena y Elia, por ser como las hermanas que nunca tuve.

A mis papás por el apoyo económico y moral.

## ÍNDICE

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE TESIS.....	ii
CRÉDITOS INSTITUCIONALES.....	iii
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS .....	vi
ÍNDICE .....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	x
ÍNDICE DE TABLAS .....	xi
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. SUSTANCIAS HÚMICAS .....	3
2.2. FORMACIÓN DE LAS QUINONAS.....	6
2.3. PROCESOS EN LOS QUE INTERVIENEN LAS SUSTANCIAS HÚMICAS ....	7
2.3.1. Aceptores de electrones en la respiración microbiana .....	8
2.3.2. Mediadores redox en procesos de oxidorreducción .....	11
2.3.3. Donadores de electrones para microorganismos .....	13
2.4. HIDROCARBUROS .....	14
2.4.1. Metano .....	15
2.4.1.1. Fuentes de metano.....	16
2.4.1.1.1. Actividades antropogénicas.....	16
2.4.1.1.2. Fuentes naturales.....	17
2.4.1.2. Oxidación anaerobia de metano.....	18
2.4.1.3. Termodinámica de la reacción .....	22
2.4.2. Benceno .....	23
2.4.2.1. Toxicidad .....	23
2.4.2.2. Degradación de benceno .....	24
2.4.3. Naftaleno .....	27
2.4.3.1. Degradación de naftaleno .....	27
III. JUSTIFICACIÓN .....	30
IV. HIPÓTESIS.....	31
V. OBJETIVOS.....	31

5.1. GENERAL .....	31
5.2. ESPECÍFICOS .....	31
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
6.1. MATERIALES.....	32
6.1.1. Inóculos .....	32
6.1.2. Medio basal .....	33
6.2. MÉTODOS .....	33
6.2.1. Síntesis de óxidos de Fe(III) y Mn(IV) .....	33
6.2.1.1. Goetita (FeOOH) .....	33
6.2.1.2. Vernadita (MnO <sub>2</sub> ).....	33
6.2.2. Experimentos en lote para la biodegradación de metano.....	34
6.2.2.1. Incubación .....	34
6.2.3. Experimentos en lote para la biodegradación de benceno y naftaleno .....	36
6.2.3.1. Incubación .....	36
6.2.3.1.1. Tratamientos con AQDS.....	36
6.2.3.1.2. Tratamientos con ácidos húmicos .....	36
6.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS.....	37
6.3.1. Reducción de AQDS .....	37
6.3.2. Concentración de metano .....	37
6.3.3. Concentración de benceno.....	38
6.3.4. Concentración de naftaleno.....	38
6.3.5. Concentración de sulfato y nitrato .....	39
6.3.6. Concentración de Fe (II) y capacidad de transferencia de electrones.....	39
VII. RESULTADOS.....	41
7.1. EXPERIMENTOS DE OXIDACIÓN ANAEROBIA CON EL INÓCULO UAM..	41
7.2. EXPERIMENTOS DE OXIDACIÓN ANAEROBIA CON EL INÓCULO POZA RICA.....	41
7.2.1. Oxidación anaerobia de metano.....	41
7.2.2. Oxidación anaerobia de benceno .....	41
7.2.2.1. Tratamientos con AQDS como aceptor final de electrones .....	41
7.2.3.2. Tratamientos con ácidos húmicos como aceptor final de electrones .....	43

7.2.3. Oxidación anaerobia de naftaleno .....	44
7.3. EXPERIMENTOS DE OXIDACIÓN ANAEROBIA CON EL INÓCULO ÉBANO .....	44
7.3.1. Oxidación anaerobia de metano.....	44
7.3.1.1. Ciclos de oxidación.....	44
7.3.2. Oxidación anaerobia de benceno .....	48
7.3.2.1. AQDS como aceptor de electrones .....	48
7.3.3. Oxidación anaerobia de naftaleno .....	49
VIII. DISCUSIÓN .....	50
8.1. OXIDACIÓN ANAEROBIA DE METANO .....	50
8.2. OXIDACIÓN ANAEROBIA DE BENCENO .....	53
IX. CONCLUSIONES .....	56
X. FUTUROS EXPERIMENTOS .....	57
XI. REFERENCIAS .....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FÍGURA</b>	<b>PÁGINA</b>
1. Esquema de las fracciones principales del humus.....	4
2. Representación esquemática de la teoría polifenólica de formación de la sustancias húmicas.....	7
3. Estructura general de las quinonas.....	8
4. Estructuras moleculares de la Antraquinona-2-sulfonato (AQS) y Antraquinona-2,6-disulfonato (AQDS).....	9
5. Reciclaje de la AH <sub>2</sub> QDS por el Fe (III).....	10
6. Algunas estructuras de hidrocarburos.....	15
7. Estructura de la coenzima F430.....	20
8. a) Consumo de Benceno por el inóculo Poza Rica. b) Concentración de AH <sub>2</sub> QDS.....	42
9. Consumo de Benceno por el inóculo Poza Rica y ácidos húmicos como aceptores finales de electrones.....	43
10. a) Consumo de Metano por el inóculo Ébano para el primer ciclo de degradación. b) Concentración de AH <sub>2</sub> QDS.....	45
11. a) Consumo de Benceno por el inóculo Ébano. b) Concentración de AH <sub>2</sub> QDS.....	49

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA</b>	<b>PÁGINA</b>
1. Propiedades generales de las sustancias húmicas y sus efectos en el suelo.....	3
2. Composición elemental de las sustancias húmicas.....	5
3. Distribución relativa de grupos funcionales en ácidos húmicos y ácidos fúlvicos.....	5
4. Biodegradación de contaminantes por medio de microorganismos reductores.....	11
5. Transformación reductiva de contaminantes utilizando sustancias húmicas como mediadores redox.....	12
6. Estudios de oxidación anaerobia de metano con diferentes aceptores finales de electrones.....	20
7. Comparación termodinámica para la biodegradación de metano con diversos aceptores de electrones.....	22
8. Estudios de oxidación de benceno con diferentes aceptores finales de electrones.....	25
9. Estudios de oxidación de naftaleno con diferentes aceptores finales de electrones.....	28
10. Caracterización de los inóculos.....	32

## RESUMEN

### Oxidación anaerobia de hidrocarburos acoplada a la reducción de sustancias húmicas

Las sustancias húmicas (SH) son componentes muy estables de la materia orgánica natural que se encuentran ampliamente distribuidas en ambientes acuáticos y terrestres, las cuales intervienen en procesos de biotransformación anaerobia de contaminantes tanto orgánicos como inorgánicos.

La contaminación del medio ambiente por hidrocarburos como el metano, benceno y naftaleno son de vital importancia, debido a que son altamente tóxicos, carcinogénicos y de difícil degradación. Por un lado, el metano es un gas de efecto invernadero que se produce de forma natural y que al ser liberado a la atmósfera contribuye de forma significativa al calentamiento global, mientras que el benceno y naftaleno se encuentran en cuerpos de agua por emanaciones naturales de petróleo o debido a las actividades antropogénicas.

La oxidación anaerobia de hidrocarburos utilizando SH como aceptores finales de electrones (AFE) es un proceso poco estudiado. No existe información sobre la oxidación anaerobia de metano (OAM) utilizando sustancias húmicas como AFE, mientras que se sabe que el benceno y el naftaleno pueden ser biodegradados bajo condiciones anaerobias utilizando otros AFE como  $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{NO}_3^-$ , pero no se tienen evidencias en presencia de SH.

En este trabajo se evaluó la capacidad de diferentes inóculos para oxidar metano, benceno y naftaleno bajo condiciones anaerobias utilizando el compuesto análogo de las SH, antraquinona-2,6-disulfonato (AQDS) como AFE, así como también SH,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , Fe(III) y Mn(IV).

El inóculo Ébano fue capaz de llevar a cabo la OAM con AQDS como AFE, con una concentración de consumo de metano de 1.7 mM y una reducción de AQDS de 0.41 mM después de 42 días de incubación. De la misma manera, el tratamiento con  $\text{SO}_4^{2-}$  como AFE también mostró OAM; sin embargo, no fue posible documentar la reducción de este AFE. Por otra parte, no se observó OAM cuando se agregó  $\text{NO}_3^-$  y óxidos de Fe(III) y Mn(IV) como AFE.

La oxidación anaerobia de benceno también pudo ser documentada con los inóculos Poza Rica y Ébano al utilizar AQDS como AFE. Además, el inóculo Poza Rica mostró un consumo de benceno al final del experimento de 23.7  $\mu\text{M}$  en presencia de SH, pero no fue posible documentar la reducción de las mismas.

En este trabajo se muestran los primeros indicios de que la OAM puede ser llevada a cabo por microorganismos reductores de SH, así como también plasma las primeras evidencias cuantitativas y directas de que ocurre la oxidación anaerobia de benceno con AQDS como AFE.

**PALABRAS CLAVE:** Metano, benceno, naftaleno, oxidación anaerobia, sustancias húmicas.

## ABSTRACT

### Anaerobic oxidation of hydrocarbons coupled to humic substances reduction

Humic substances (HS) are very stable components of organic matter that are ubiquitous in aquatic and terrestrial environments, which play a very important role in the anaerobic biotransformation of organic and inorganic pollutants.

Environmental pollution caused by hydrocarbons like methane, benzene and naphthalene is very important because they are classified as highly toxic, carcinogenic and hardly degradable compounds. On the one hand, methane is a naturally produced greenhouse gas, that contributes to global warming when released into the atmosphere; on the other hand, the aromatic hydrocarbons, benzene and naphthalene, are frequently found in water bodies by both natural petroleum leaks and anthropogenic activities.

Anaerobic oxidation of benzene and naphthalene has been studied applying several terminal electron acceptors (TEAs), such as  $\text{SO}_4^{2-}$  and  $\text{NO}_3^-$ . Nevertheless, there is little information documenting the anaerobic methane oxidation (AMO). In addition, no evidence has been provided that HS can serve as TEA for the anaerobic oxidation of these hydrocarbons. In this research, the capacity of different consortia to oxidize methane, benzene and naphthalene under anaerobic conditions using the humic analogue, anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS), as well as HS,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , Fe(III) and Mn(IV) as TEAs.

Ébano consortium was capable to achieve AMO with AQDS as TEA. It was observed a methane consumption of 1.7 mM and an AQDS reduction of 0.41 mM after an incubation period of 42 days. In the same way, AMO was also observed when sulfate was provided as TEA; however, there was no evidence of AMO when nitrate and ferric and manganese oxides were supplied as TEAs. Anaerobic benzene oxidation occurred with Ébano and Poza Rica consortia utilizing AQDS as TEA. Additionally, Poza Rica consortium consumed 23.7 mM of benzene in the presence of HS; nonetheless, it was not possible to document their reduction.

To the best of our knowledge, the present study is the first research that demonstrates that AMO can be carried out by microorganisms using AQDS as TEA, and also it is the first quantitative and direct evidence that anaerobic benzene oxidation is possible utilizing AQDS as TEA.

**KEY WORDS:** Methane, benzene, naphthalene, anaerobic oxidation, humic substances.

## I. INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso vital para la vida, pero actualmente los cuerpos de agua muestran grados de contaminación alarmantes. De acuerdo a datos proporcionados por la Comisión Nacional del Agua (CNA, 2005), el 50% de los acuíferos en México presentan indicios de contaminación. La contaminación de acuíferos por hidrocarburos, como benceno y naftaleno, se debe principalmente a las actividades antropogénicas como los derrames de gasolina y la restauración de estos sitios es de gran interés debido a la alta toxicidad de estos contaminantes (CNA, 2005; Coates *et al.*, 2002; Rittman y McCarty, 2001).

La degradación de benceno y naftaleno está bien documentada bajo condiciones aerobias, pero generalmente los cuerpos contaminados con estos hidrocarburos presentan condiciones anaerobias (Lovley, 1997). Se creía que la degradación anaerobia de estos hidrocarburos no podía realizarse, pero existe evidencia de que pueden degradarse *in situ*, utilizando aceptores de electrones como  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ , Fe(III) y/o Mn(IV) (Rockne *et al.*, 2000; Anderson y Lovley, 1999; Lovley, 2000, Villatoro-Monzón *et al.*, 2008).

El metano es considerado como un poderoso gas de efecto invernadero que contribuye considerablemente al calentamiento global y su liberación a la atmósfera proviene de diferentes fuentes, tanto naturales como antropogénicas (EPA, 2006).

La oxidación anaerobia de metano está muy poco estudiada, debido en parte a la dificultad para simular las condiciones naturales en el laboratorio, y sólo existen reportes de este proceso con  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{SO}_4^{2-}$  como aceptores finales de electrones (Thauner y Shima, 2008).

Por otro lado, las quinonas son grupos funcionales que forman parte de las sustancias húmicas, las cuales juegan un papel importante en la conversión anaerobia de contaminantes orgánicos e inorgánicos (Field y Cervantes, 2005). Las sustancias húmicas, así como diversas quinonas, funcionan como aceptores de electrones durante la oxidación anaerobia de compuestos como fenoles, dicloroetano, sulfuro e hidrocarburos como tolueno, etilbenceno, xilenos, entre

otros (Cervantes *et al.*, 2008; Cervantes *et al.*, 2000a; Bradley *et al.*, 1998; Curtis y Reinhard, 1994; Van der Zee *et al.*, 2000b; Cervantes *et al.*, 2001a; Jahn *et al.*, 2005).

Debido a que las sustancias húmicas se encuentran ampliamente distribuidas en distintos ambientes naturales, serían una alternativa para estimular la mineralización de contaminantes prioritarios durante la biorremediación *in situ* de cuerpos de agua contaminados con hidrocarburos. Además, su estudio es de suma importancia para lograr un mejor entendimiento de los procesos de biodegradación anaerobia de metano, benceno y naftaleno.

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la capacidad de diferentes sedimentos para oxidar anaeróbicamente benceno, naftaleno y metano, utilizando quinonas como aceptores finales de electrones.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. SUSTANCIAS HÚMICAS

Las sustancias húmicas son los mayores componentes de la materia orgánica natural (MON) presente en suelos y agua, al igual que en depósitos orgánicos como sedimentos de lagos, pantanos, hulla café y esquistos. Aportan el color café característico que toman los residuos de plantas en descomposición y contribuyen con la coloración café o negra de la superficie de los suelos (IHSS, 2007). Sus propiedades químicas dependen de las características de la materia orgánica de la que se derivan, así como de las propiedades del ambiente (Stevenson, 1994). En la Tabla 1 se muestran las propiedades generales de las sustancias húmicas y los efectos que tienen en el suelo.

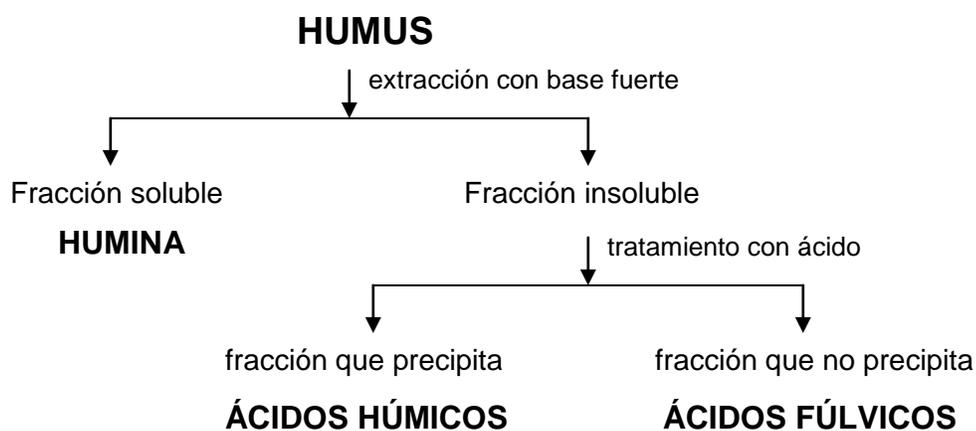
**Tabla 1.** Propiedades generales de las sustancias húmicas y sus efectos en el suelo.

PROPIEDAD	OBSERVACIÓN	EFEECTO EN EL SUELO
Color	El color oscuro de muchos suelos es causado por la materia orgánica	Facilita el calentamiento
Retención de agua	La materia orgánica puede mantener 20 veces su peso en agua	Ayuda a prevenir la deshidratación del suelo
Combinación con arcillas minerales	Partículas de suelo unidas en agregados	Permite el intercambio de gases e incrementa la permeabilidad del suelo.
Quelación	Forma complejos estables con $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Mn}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ y otros cationes polivalentes	Incrementa la biodisponibilidad de micronutrientes para plantas.
Solubilidad en agua	Insoluble en agua	Poca materia orgánica se pierde en lixiviados
Acción buffer	Capacidad de amortiguación en bajos rangos de acidez, neutralidad y alcalinidad.	Ayuda a mantener reacciones uniformes en el suelo

Fuente: Stevenson, 1994.

Las sustancias húmicas están constituidas por mezclas complejas, heterogéneas y de alto peso molecular, formadas mediante reacciones químicas y bioquímicas durante la descomposición y transformación de residuos de plantas y animales. Este proceso, que involucra múltiples reacciones, se le conoce como humificación. La lignina de las plantas y sus productos de transformación, al igual que los polisacáridos, melanina, cutina, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, entre otras, son componentes importantes que forman parte en este proceso (IHSS, 2007). Una vez formadas, las sustancias húmicas son altamente recalcitrantes, lo cual se ve reflejado en sus largos tiempos de residencia en el ambiente que pueden ser entre 250 y 1900 años (Stevenson, 1994).

Las sustancias húmicas presentes en suelos y en sedimentos pueden dividirse en tres fracciones principales: ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) y humina (Fig. 1). Los ácidos húmicos y los ácidos fúlvicos pueden extraerse del suelo y de otras fuentes en fase sólida usando una base fuerte como NaOH o KOH. Los ácidos húmicos son insolubles a pH bajos y pueden precipitar con la adición de un ácido fuerte, mientras que la humina no puede extraerse con ácidos ni bases fuertes (IHSS, 2007). Respecto a su composición elemental, los AH y los AF muestran ligeras variaciones (Tabla 2) (Stevenson, 1994).



**Figura 1.** Esquema de las fracciones principales del humus (Stevenson, 1994).

**Tabla 2.** Composición elemental de las sustancias húmicas.

ELEMENTO	ACIDOS HÚMICOS	ÁCIDOS FÚLVICOS
Carbono	53.8 – 58.7 %	40.7 – 50.6 %
Oxígeno	32.6 – 38.3 %	39.7 – 49.8 %
Hidrógeno	3.2 – 6.2 %	3.8 – 7.0 %
Nitrógeno	0.8 – 4.3 %	0.9 – 3.3 %
Azufre	0.1 – 1.5 %	0.1 – 3.6 %

Fuente: Stevenson, 1994.

Por otra parte, se ha reportado que las sustancias húmicas contienen una gran variedad de grupos funcionales como: -COOH, -OH fenólico, quinonas, hidroquinonas, amino, alcoholes, aldehídos, entre otros (Stevenson, 1994). En la Tabla 3 se muestra la distribución relativa de estos grupos funcionales en las sustancias húmicas.

**Tabla 3.** Distribución relativa de grupos funcionales en ácidos húmicos y ácidos fúlvicos.

GRUPO FUNCIONAL	ÁCIDOS HÚMICOS mol C/kg	ÁCIDOS FÚLVICOS mol C/kg
-COOH	360	820
<b>C=O (quinonas, cetonas)</b>	<b>290</b>	<b>270</b>
-OCH <sub>3</sub>	60	80
Ácidos débiles + -OH de alcoholes	260	610
-OH fenólico	390	300
Acidez total	670	1030

Donde: Ácidos débiles - OH referente a otros grupos funcionales.

Fuente: Stevenson, 1994.

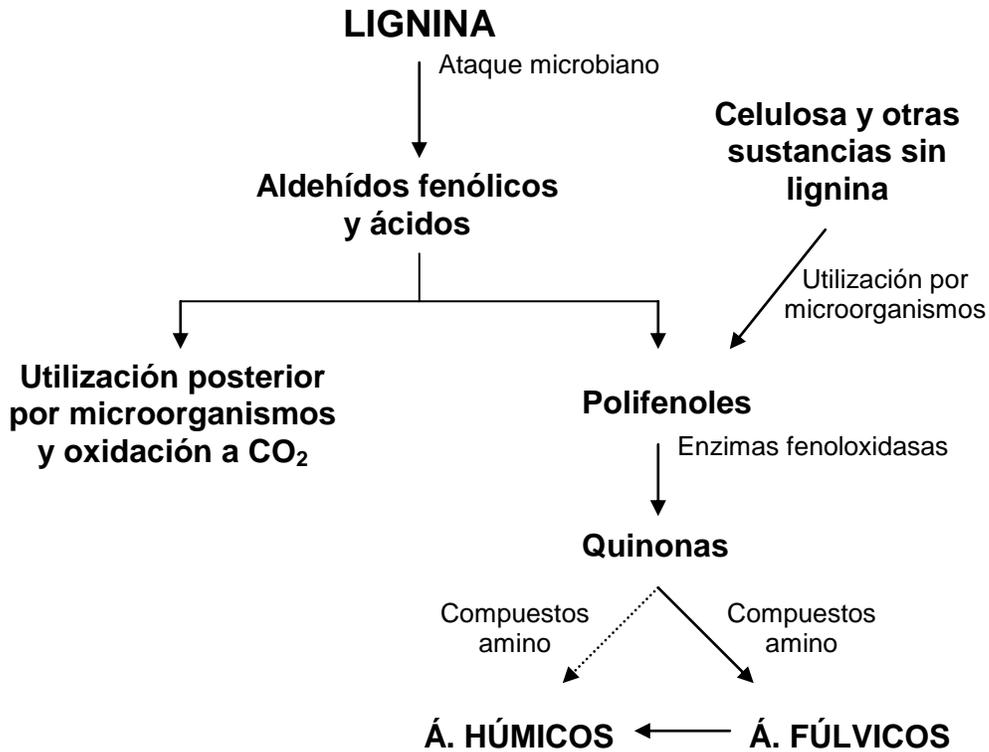
Particularmente para las quinonas, algunos estudios muestran que los ácidos húmicos tienen una mayor cantidad de éstas (140-210 mol C/kg) que los ácidos fúlvicos (28-145 mol C/kg), y esta concentración varía dependiendo del clima (Stevenson, 1994).

## 2.2. FORMACIÓN DE LAS QUINONAS

Las posibles fuentes de polifenoles (precursores de las quinonas), pueden ser lignina, material celular microbiano, fenoles en plantas, glucósidos y taninos, siendo los primeros a los que se les ha dado mayor atención. Los hongos (basidiomicetos) pueden atacar carbohidratos simples, ciertas partes de proteínas, celulosa y lignina de la corteza de residuos de plantas, mientras que algunas bacterias aerobias pueden descomponer la celulosa del xilema de las plantas; ambos generando polifenoles. De la misma manera, los microorganismos pueden generar polifenoles de la descomposición de otras fuentes que no contienen lignina como musgos, algas, fuentes de carbono no aromáticas, hidrocarburos insaturados, entre otros (Stevenson, 1994).

Los polifenoles son inestables y susceptibles a descomposiciones posteriores por bacterias, actinomicetos y hongos. Además, pueden sufrir recombinaciones, que pueden ser de la propia molécula o con otras moléculas orgánicas, y posteriormente convertirse en quinonas. La conversión de polifenoles a quinonas puede ser química (instantánea en medio alcalino) o por la acción de enzimas polifenol-oxidasas. Las quinonas, obtenidas a partir de los polifenoles, pueden combinarse con compuestos que contienen nitrógeno como los aminoácidos y generar a las sustancias húmicas (Stevenson, 1994).

Las quinonas que se originan de la lignina y las que son sintetizadas por microorganismos, son las subunidades de mayor proporción que conforman a las sustancias húmicas. La teoría propone que primero se forman los ácidos fúlvicos, después los ácidos húmicos, siendo la humina la última en formarse (Stevenson, 1994). En la Figura 2 se muestra la ruta de formación de quinonas mediante polifenoles, para su posterior transformación a ácidos fúlvicos y ácidos húmicos.



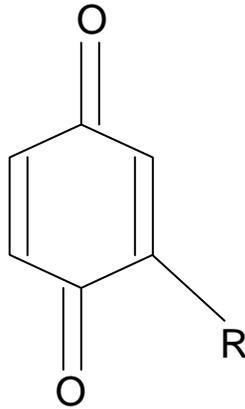
**Figura 2.** Representación esquemática de la teoría polifenólica de formación de las sustancias húmicas (Stevenson, 1994).

### 2.3. PROCESOS EN LOS QUE INTERVIENEN LAS SUSTANCIAS HÚMICAS

Las sustancias húmicas están involucradas en muchos procesos que ocurren en cuerpos de agua y suelos, como la nutrición de las plantas, la amortiguación del pH, la movilidad y toxicidad de metales traza, la biodisponibilidad de elementos químicos y el transporte de múltiples elementos. Además, en los últimos años, se ha observado que juegan un papel importante en la biodegradación y biotransformación anaerobia de compuestos orgánicos e inorgánicos (IHSS, 2007; Cervantes-Carrillo, 2002).

Las sustancias húmicas, específicamente sus subestructuras quinona (Fig. 3), pueden tener tres distintos papeles durante el transporte de electrones que soportan la (bio)transformación de contaminantes prioritarios:

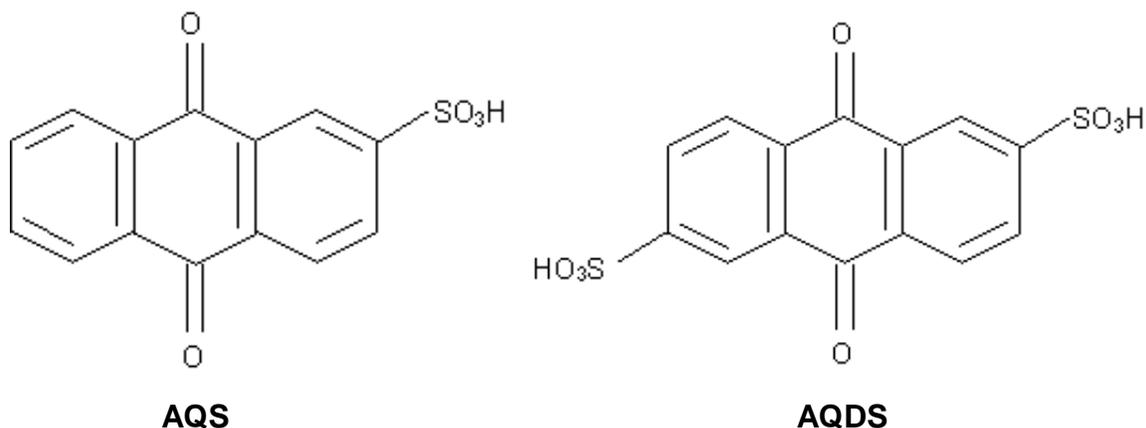
- 1.- Aceptores de electrones en la respiración microbiana
- 2.- Mediadores redox en procesos de oxidorreducción
- 3.- Donadores de electrones para microorganismos



**Figura 3.** Estructura general de las quinonas.

### **2.3.1. Aceptores de electrones en la respiración microbiana**

El humus es extremadamente recalcitrante para servir como fuente de carbono y energía en ambientes anaerobios; sin embargo, ciertas subestructuras del humus (quinonas), son capaces de funcionar como aceptores terminales de electrones en la biodegradación anóxica de una gran variedad de sustratos (Field *et al.*, 2000). La antraquinona-2,6-disulfonato (AQDS) y la antroquinona-2-sulfonato (AQS) (Fig. 4) han sido utilizadas como estructuras modelo de las quinonas en numerosos estudios que documentan su impacto en la (bio)transformación de diferentes contaminantes prioritarios (Aranda-Tamaura *et al.*, 2007; Bradley *et al.*, 1998).



**Figura 4.** Estructuras moleculares de la Antraquinona-2-sulfonato (AQS) y Antraquinona-2,6-disulfonato (AQDS).

Se ha reportado que la bacteria *Geobacter metallireducens* fue capaz de utilizar sustancias húmicas purificadas como aceptores terminales de electrones ligado a la oxidación anaerobia de acetato a CO<sub>2</sub>. Resultados similares se obtuvieron utilizando AQDS, la cual fue reducida a antrahidroquinona-2,6-disulfonato (AH<sub>2</sub>QDS) durante las incubaciones microbianas (Lovley *et al.*, 1996).

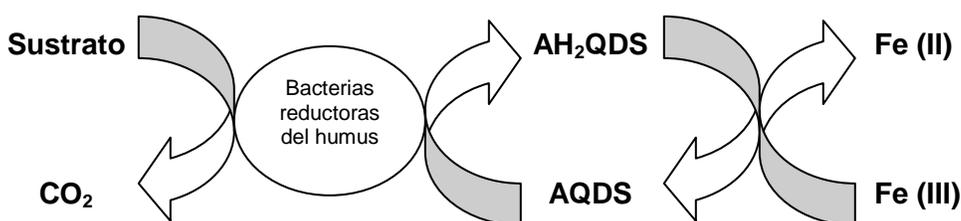
Al igual que *G. metallireducens*, existen otros microorganismos que son capaces de utilizar sustancias húmicas y diversas quinonas como aceptores finales de electrones. La gran diversidad de microorganismos incluye a sulfato-reductores, fermentativos, halorespiradores y metanogénicos, y la capacidad de reducir sustancias húmicas se ha encontrado en una gran cantidad de hábitats naturales y artificiales (sedimentos enriquecidos orgánicamente, suelos contaminados, lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales, entre otros) (Cervantes *et al.*, 2000b; Coates *et al.*, 1998; Lovley *et al.*, 1996; Benz *et al.*, 1998; Cervantes *et al.*, 2002).

Se ha reportado que también otros contaminantes como *p*-cresol, fenol y metil-terbutil-eter, han sido degradados por diferentes microorganismos utilizando sustancias húmicas (AQDS y ácidos húmicos) como aceptores finales de electrones (Cervantes *et al.*, 2008; Finneran y Lovley, 2001).

Bradley (1998) mostró que los microorganismos contenidos en un sedimento rico en materia orgánica, fueron capaces de oxidar cloruro de vinilo y

dicloroeteno a  $\text{CO}_2$  cuando se agregaron ácidos húmicos como aceptores finales de electrones. Se observó una mineralización del 85% para el cloruro de vinilo y del 25% para el dicloroeteno, después de un periodo de 50 días, mientras que no se observó degradación de los compuestos en ausencia de los ácidos húmicos (Bradley *et al.*, 1998).

Por otra parte, las sustancias húmicas reducidas pueden ser oxidadas directamente por óxidos metálicos, como  $\text{Fe(III)}$  y  $\text{Mn(IV)}$ , los cuales son muy abundantes en suelos y sedimentos (Cervantes *et al.*, 2002; Fredrickson *et al.*, 2000; Kieft *et al.*, 1999; Lovley *et al.*, 1999). Este mecanismo de reciclaje (Figura 5), permite que cantidades muy bajas de quinonas puedan actuar como catalizadores en la restauración de acuíferos contaminados con hidrocarburos en los que abundan estos metales oxidados (Lovley *et al.*, 1996).



**Figura 5.** Reciclaje de la  $\text{AH}_2\text{QDS}$  por el  $\text{Fe(III)}$ .

En un estudio realizado por Cervantes *et al.* (2001) para oxidar de forma microbiana tolueno a  $\text{CO}_2$  con AQDS como mediador redox, se añadió oxihidróxido de hierro ( $\text{FeOOH}$ ) con el fin de reciclar la  $\text{AH}_2\text{QDS}$  (aceptor final de electrones). Los resultados mostraron que la oxidación del tolueno fue mayor en la muestra que contenía  $\text{Fe(III)}$  con una biodegradación del 65%, comparada con un 1.7% en la muestra en ausencia de  $\text{Fe(III)}$ , lo que demuestra que si no se cuenta con un sistema de reciclaje como  $\text{Fe(III)/Fe(II)}$ , el agotamiento de la AQDS no permite un buen porcentaje de biodegradación de tolueno (Cervantes *et al.*, 2001a). En la Tabla 4 se muestran otros contaminantes que han sido biodegradados, utilizando sustancias húmicas como aceptores finales de

electrones, así como la fuente de microorganismos capaces de reducir las sustancias húmicas.

**Tabla 4.** Biodegradación de contaminantes por medio de microorganismos reductores.

DONADOR DE ELECTRONES	ACEPTOR DE ELECTRONES	INÓCULO	REFERENCIA
Dicloroetano y cloruro de vinilo	AQDS Y AH	Sedimento fresco rico en compuestos orgánicos	Bradley <i>et al.</i> , 1998
Tolueno	AQDS Y AH	Sedimentos anaerobios enriquecidos	Cervantes <i>et al.</i> , 2001a
Fenol y <i>p</i> -cresol	AQDS	Lodo granular metanogénico	Cervantes <i>et al.</i> , 2008a
MTBE	AQDS	Cultivo líquido estable	Wei y Finneran, 2009

Donde: AQDS – Antraquinona-2,6-disulfonato, AH – Ácidos Húmicos, MTBE – Metil-terbutil-éter.

### 2.3.2. Mediadores redox en procesos de oxidorreducción

Las sustancias húmicas, además de funcionar como aceptores de electrones, también intervienen en la transferencia de electrones durante la (bio)transformación de contaminantes conteniendo grupos electrofílicos, como colorantes azo, nitroaromáticos, compuestos polihalogenados y radionuclidos (Van der Zee *et al.*, 2000a; Hofstetter *et al.*, 1999; Curtis y Reinhard, 1994; Fredrickson *et al.*, 2000). Existe evidencia de que las quinonas y las sustancias húmicas pueden aumentar, en varios órdenes de magnitud, la velocidad de transferencia de electrones, desde un donador de electrones hasta los contaminantes electrofílicos, tanto en condiciones abióticas como en sistemas biológicos (Cervantes-Carrillo, 2002; Field y Cervantes, 2001b).

Cervantes *et al.* (2001) estudiaron el papel de la AQDS en un reactor anaerobio para acelerar la biotransformación de Naranja Ácido 7 (AO7 por sus siglas en inglés). Observaron que concentraciones muy bajas de AQDS (3µm) debido a su regeneración, aceleraban el proceso de reducción del AO7 a sus respectivas aminas aromáticas con una eficiencia de remoción del 90%

comparada con un 70% en el reactor sin quinona para un tiempo de retención hidráulico de 2 h (Cervantes *et al.*, 2001b).

Las quinonas y la MON pueden actuar como mediadores redox en la reducción química de nitrobenzenos a sus anilinas correspondientes utilizando el sulfuro como donador de electrones. Se ha observado que la velocidad de reducción del grupo nitro se incrementa hasta en 500 veces, incluso con bajas concentraciones de MON, por lo que pueden actuar como catalizadores para este tipo de reacciones (Dunnivant, 1992). En la tabla 5 se muestran diversos estudios en los que se utilizaron diferentes sustancias húmicas para la reducción de diversos contaminantes.

**Tabla 5.** Transformación reductiva de contaminantes utilizando sustancias húmicas como mediadores redox.

DONADOR	MEDIADOR REDOX	REACCIÓN REDUCTIVA	CARÁCTERÍSTICAS	REFERENCIA
Glucosa	AQS, LAW	AR27, AR18, AO20, AB1, entre otros → aminas aromáticas	La adición de quinonas aumentó las velocidades de reducción de todos los colorantes, siendo mayores para AQS con <i>Sphingomona xenophaga</i> y para LAW con <i>Escherichia coli</i> .	Rau <i>et al.</i> , 2002
Glucosa y AGV	AQDS, AQS, rivo flavina	RR2, AO7, MY10 → aminas aromáticas	La adición de los mediadores redox incrementó la velocidad de decoloración de los 3 colorantes 8 veces mas que en ausencia de mediador. A mayor temperatura, mayor decoloración.	dos Santos <i>et al.</i> , 2004
Sulfato	AQDS, Rivo flavina	RO14, DB53 y DB71 → aminas aromáticas	La adición de ribo flavina y la presencia de sulfato, incremento el valor de la <i>k</i> en 2, 3.6 y 2 veces para RO14, DB53 y DB71 respectivamente.	Cervantes <i>et al.</i> , 2007

**Tabla 5.** (Continuación).

DONADOR	MEDIADOR REDOX	REACCIÓN REDUCTIVA	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
Sulfuro	AQDS, NQS y LAW	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$	Las 3 quinonas mostraron capacidad de reducir el sulfuro. La AH <sub>2</sub> QDS fungió como donador de electrones para la reducción de nitrato.	Aranda-Tamaura <i>et al.</i> , 2007
Acetato, propionato y butirato	AH y AQDS	$\text{CCl}_4 \rightarrow \text{Cl}^-$	Se incrementó 6 veces la velocidad de reducción de CCl <sub>4</sub> y la producción de Cl <sup>-</sup> , la cual representa el 50% de la concentración inicial de CCl <sub>4</sub> (100 μM)	Cervantes <i>et al.</i> , 2004

Donde: AGV – Ácidos Grasos Volátiles; AR27- Rojo Ácido 27; AR18 – Rojo Ácido 18; AO20 – Naranja Ácido 20; AB1 – Negro Ácido 1; RR2 – Rojo Reactivo 2; AO7 – Naranja Ácido 7; MY10 – Amarillo Mordante 10; RO14 – Naranja Reactivo 14; DB53 - Azul Directo 53; DB71 - Azul Directo 71; AQS – Antraquinona-2-sulfonato; AH – Ácidos Húmicos; AQDS – Antraquinona-2,6-disulfonato; NQS – 1,2-Naftoquinona-4-sulfonato; LAW – 2-hidroxi-1,4-naftoquinona; *k* – Constante cinética de decoloración de primer orden; NO<sub>3</sub><sup>-</sup> – Nitrato; N<sub>2</sub> – Nitrógeno molecular; CCl<sub>4</sub>– Tetracloruro de Carbono; Cl<sup>-</sup> - Cloro inorgánico.

Por otra parte, la utilización de sustancias húmicas mostró un incremento en la velocidad de reducción de radionuclidos a especies menos solubles. Ciertas bacterias resistentes a la radiación, como *Deinococcus radiodurans*, mostraron reducir casi completamente concentraciones entre 5 y 200 μM de U(VI) en forma soluble, a U(IV) insoluble en presencia de 100 μM de AQDS, mientras que en ausencia del mediador, el microorganismo no fue capaz de reducirlo. De igual forma, la bacteria fue capaz de reducir la partícula β Tc(VII) soluble a una forma insoluble Tc(IV) en presencia de AQDS (Fredrickson *et al.*, 2000).

### 2.3.3. Donadores de electrones para microorganismos

Existen otros estudios que muestran que las sustancias húmicas reducidas y las hidroquinonas modelo funcionan como donadores de electrones para

microorganismos, proporcionándoles energía para su metabolismo (Field y Cervantes, 2005).

La oxidación de AH<sub>2</sub>QDS puede generar energía para mantener el crecimiento de bacterias reductoras de fumarato a succinato, como *Shewanella alga* y *Geobacter sulfurreducens*. Se observó que estos microorganismos no eran capaces de crecer en ausencia de la quinona, o del fumarato. Además de reducir fumarato a succinato, la bacteria *Wolinella succinogenes* mostró la capacidad de oxidar la AH<sub>2</sub>QDS transfiriendo los electrones a la reducción del NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y finalmente a N<sub>2</sub> (desnitrificación), o con arseniato o seleniato como aceptores finales de electrones. También, se ha reportado que las hidroquinonas tienen la capacidad de donar electrones para la reducción microbiana de perclorato (ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>), tal como una proteobacteria aislada de la cepa CKB muy parecida a la *Rhodocyclus tenuis* (Lovley *et al.*, 1999).

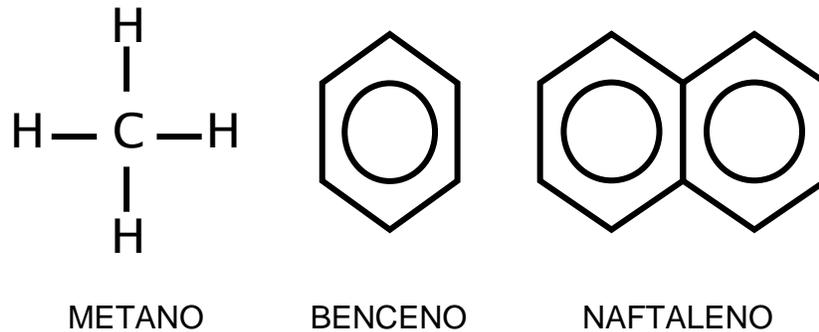
## 2.4. HIDROCARBUROS

Los hidrocarburos son compuestos orgánicos formados ya sea como metabolitos por bacterias, arqueobacterias, plantas y animales, o como productos de la transformación abiótica de la biomasa muerta, y están constituidos por átomos de carbono e hidrógeno. Son compuestos altamente energéticos y pueden ser utilizados como sustratos por una gran variedad de microorganismos aerobios y anaerobios (Widdel *et al.*, 2006).

El estudio de microorganismos anaerobios que son capaces de degradar hidrocarburos es de especial interés debido a que:

- a) Son contaminantes de difícil degradación que se pueden encontrar en ambientes subterráneos donde las condiciones son principalmente anaerobias como sedimentos, hidratos gaseosos, reservas de petróleo.
- b) La explotación del petróleo siempre está conectada con su movilización por lo que al estar en contacto con los microorganismos incrementa la posibilidad de su degradación.

- c) En acuíferos, así como en zonas del fondo marino que se encuentren contaminados por derrames de petróleo, la degradación aerobia está limitada por la cantidad de oxígeno disuelto que se encuentre en el agua (Widdel *et al.*, 2006).



**Figura 6.** Algunas estructuras de hidrocarburos.

#### 2.4.1. Metano

El metano ( $\text{CH}_4$ ) es el hidrocarburo más simple, abundante y estable que existe en la naturaleza (Figura 6). Es el principal constituyente del gas natural y una importante fuente de energía. Una vez que ha sido liberado a la atmósfera, absorbe la radiación infrarroja, contribuyendo de esta manera al calentamiento de la atmósfera, de aquí que se le considere como un poderoso gas de efecto invernadero. Puede permanecer en la atmósfera entre 9 y 15 años y es 21 veces más efectivo para atrapar el calor en la atmósfera si se compara con el  $\text{CO}_2$  (Widdel *et al.*, 2006, EPA, 2007).

La información histórica que se tiene sobre el metano, basada en los análisis de las burbujas de aire atrapadas en las capas de hielo de los polos, indican que el metano es más abundante en la tierra hoy en día, que durante los pasados 400,000 años. Desde 1970, las concentraciones globales promedio de metano, se han incrementado en un 150%, de 700 a 1745 partes por billón por volumen (ppbv). Durante la década pasada, las concentraciones han seguido aumentando aproximadamente 20 ppbv por año, mientras que otros estudios

mostraron que la concentración de metano atmosférico (1751 ppbv) se mantuvo estable entre 1999 y 2002 (Petit *et al.*, 1999, Dlugokencky *et al.*, 2003).

#### **2.4.1.1. Fuentes de metano**

El metano es emitido a la atmósfera por una variedad de fuentes tanto antropogénicas como naturales (EPA, 2006).

##### **2.4.1.1.1. Actividades antropogénicas**

Se estima que el 60% de las emisiones globales de metano son debidas a las actividades humanas como la combustión estacionaria y móvil, los procesos industriales, los sistemas petroleros, entre otros. En estudios recientes, la cantidad de metano liberada por las actividades realizadas por el hombre fue estimada en 275 Tg (teragramos) CH<sub>4</sub>/año y tiende a aumentar año con año (EPA, 2006, IPCC, 1996).

**Rellenos sanitarios.-** Son la mayor fuente de producción de metano antropogénico, generando 34% de las emisiones globales. El metano se genera debido a la descomposición de los desechos naturales bajo condiciones anaerobias. La cantidad de metano que se genera depende de la cantidad y del contenido de humedad de los desechos, así como del diseño y el manejo del sitio (EPA, 2006).

**Sistemas de gas natural y petróleo.-** El metano es el compuesto primario del gas natural, las pérdidas de metano ocurren durante la producción, procesamiento, almacenamiento y distribución del gas natural. Debido a que el gas se encuentra en conjunto con el petróleo, los procesos de refinación, transporte y almacenamiento de petróleo crudo también son una fuente de emisión de metano (Beck *et al.*, 1993).

**Minas de carbón.-** Existen cantidades de metano atrapadas en depósitos de carbón que son liberadas al ambiente mediante las operaciones mineras en la

extracción del mismo. De igual forma, una vez que ha sido extraído, el manejo del carbón también genera emisiones de metano (Beck *et al.*, 1993).

**Tratamiento de aguas residuales.-** El tratamiento de aguas municipales e industriales, así como el tratamiento de lodos activados pueden producir metano si se trata anaeróbicamente debido a la descomposición de la materia orgánica presente, aunque este podría evitarse mediante la captura y aprovechamiento del metano generado (EPA, 2006).

**Cultivos de arroz.-** El metano se genera durante el proceso de inundado de los campos de arroz por la descomposición anaerobia de la materia orgánica contenida en el suelo. Estas tierras inundadas son ambientes ideales para la producción del mismo debido a los altos contenidos de sustratos orgánicos, humedad y bajas concentraciones de oxígeno. Los niveles de emisión depende de las condiciones del suelo, prácticas de producción y clima (EPA, 2006).

**Fermentación entérica de ganado.-** Entre los animales domésticos, los rumiantes (vacas, cabras, ovejas) generan cantidades significativas de metano debido a su proceso digestivo. En el estómago de estos animales, ocurre una fermentación microbiana que convierte el alimento en productos que puedan ser más fácilmente digeridos y se genera metano como un subproducto, el cual es exhalado por los animales. Por otro lado, el mal manejo del estiércol genera cantidades considerables de metano, ya que regularmente se tratan en sistemas como lagunas o tanques y se propicia la descomposición anaerobia de la materia orgánica resultando en la generación de metano (Johnson *et al.*, 2000).

#### **2.4.1.1.2. Fuentes naturales**

Las emisiones de metano por fuentes naturales dependen de variables ambientales como la temperatura y la precipitación pluvial. Existe información que indica que las emisiones de fuentes naturales son alrededor de 190 Tg CH<sub>4</sub>/año (EPA, 2006).

**Pantanos.-** Son los responsables del 76% de las emisiones globales de metano (145 Tg CH<sub>4</sub>/año). Los pantanos, proporcionan el hábitat adecuado para

las bacterias que producen metano, durante la descomposición de la materia orgánica, debido a sus condiciones anóxicas que presentan (EPA, 2006).

**Termitas.-** La proporción de las emisiones de metano debido a la acción de las termitas es del 11% de las emisiones globales de metano (20 Tg CH<sub>4</sub>/año). La producción de metano es debido a la acción de su proceso digestivo natural, y la cantidad que se genera varía entre especies (EPA, 2006).

**Océanos.-** Son los responsables del 8% de las emisiones globales naturales (15 Tg CH<sub>4</sub>/año). La fuente de metano de los océanos no está completamente clara, algunas de las fuentes son la digestión anaeróbica en zooplancton y peces, así como el proceso de metanogénesis en áreas de drenaje cercanas a las regiones costeras (EPA, 2006).

**Hidratos.-** Se estima que la contribución en las emisiones globales naturales debido a los hidratos es del 5% (10 Tg CH<sub>4</sub>/año). Los hidratos de metano son depósitos sólidos compuestos de cavidades de moléculas de agua que contienen metano. Se pueden encontrar en las profundidades de las regiones polares y en los sedimentos de los océanos. El metano se libera con los cambios en la temperatura, presión, concentración salina, entre otros parámetros (EPA, 2006).

#### **2.4.1.2. Oxidación anaerobia de metano**

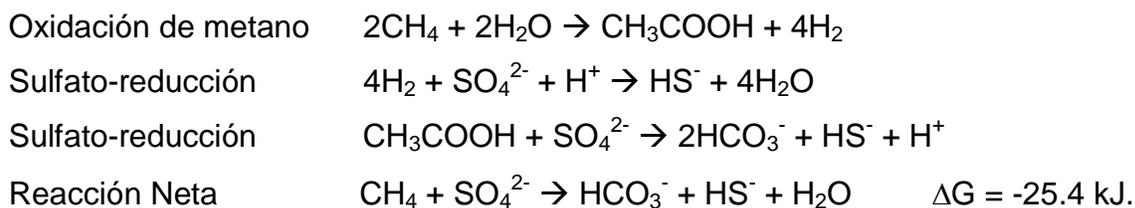
A pesar de los grandes reservorios y las altas tasas de producción de metano, el océano contribuye sólo en un 8% de las emisiones globales naturales, esto debido a que la oxidación anaerobia de metano (OAM), por la acción de microorganismos que utilizan el sulfato como aceptor de electrones, remueve una gran cantidad de metano antes de que llegue a la atmósfera. LA OAM es responsable de oxidar entre 70.5 y 85.3 Tg CH<sub>4</sub>/año (EPA, 2006; Reeburgh, 1976).

La primera evidencia de la OAM fue por medio de estudios geoquímicos en sedimentos marinos. Se observó que en sitios como hidratos y respiraderos de metano, este desaparecía antes de entrar en contacto con el oxígeno, siendo el

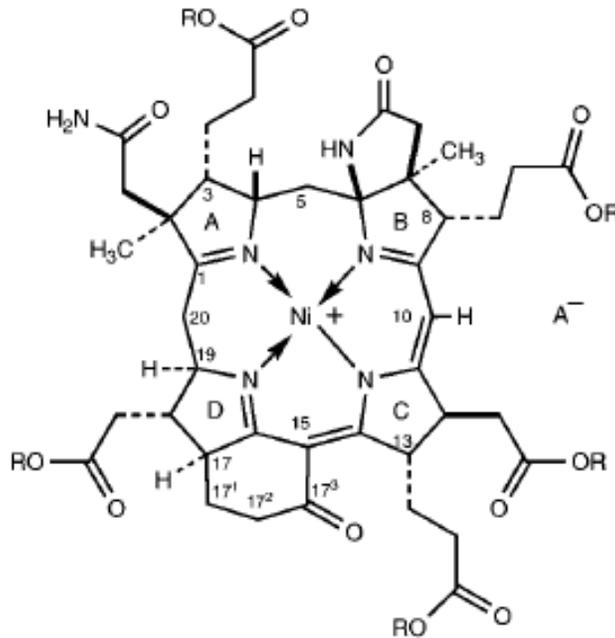
sulfato el único aceptor de electrones presente (Reeburgh, 1976; Martens y Berner, 1974).

La OAM en zonas marinas se lleva a cabo entre la zona de transición metano-sulfato por arqueobacterias que se encuentran en consorcios microbianos junto con bacterias sulfato-reductoras. Se conocen 3 grupos filogenéticos de bacterias metanotróficas marinas, ANME-1, ANME-2 y ANME-3 que corresponden principalmente a las familias de *Methanosarcinales* y *Methanomicrobiales*. Se conoce que las bacterias que efectúan la sulfato-reducción en este proceso son principalmente de los géneros *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfobulbos*. (Niemann *et al.*, 2006, Boetius *et al.*, 2000).

El mecanismo de oxidación del metano acoplado a la sulfato-reducción, se propone que ocurre al inverso de la metanogénesis (metanogénesis inversa) con base en las siguientes reacciones.



Se conoce que todas las bacterias metanogénicas utilizan la enzima metil coenzima M reductasa (MCR) (Figura 7), la cual cataliza el último paso de la metanogénesis. En este paso, un grupo metilo unido a la coenzima M se reduce y se libera una molécula de metano. La MCR se compone de subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , las cuales están codificadas por los genes *mcrA*, *mcrB* y *mcrG*. Su grupo prostético es un complejo que contiene níquel y se denomina  $F_{430}$ , con una masa molecular de 905 Da. En las bacterias metanotróficas, ANME-1 y ANME-2 se ha encontrado una enzima muy similar a la MCR y corresponde a la subunidad  $\alpha$  que corresponde al gen *mrcA* (Luton *et al.*, 2002; Springer *et al.*, 1995; Hallam *et al.*, 2003; Thauer y Shima, 2008).



**Figura 7.** Estructura de la coenzima F430 (Myar *et al.*, 2008).

Aunque es difícil llevar a cabo estudios de degradación de metano en el laboratorio, existen algunos reportes de ello. En la tabla 6 se muestran algunos de estos trabajos.

**Tabla 6.** Estudios de oxidación anaerobia de metano con diferentes aceptores finales de electrones.

AFE	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Se utilizó como inóculo el lodo generado por un reactor desnitrificante y se agregó metano a distintas presiones (1.8, 8.8, 17.8 y 35.7 kPa). Se observó la oxidación anaerobia de metano acoplada a la desnitrificación y que la velocidad de esta fue independiente de la presión parcial de metano cuando era mayor o igual a 8.8 kPa. La velocidad de desnitrificación fue de 0.25 g NO <sub>3</sub> -N/g SSV·d al inicio de los experimentos y de 4.9x10 <sup>-3</sup> g NO <sub>3</sub> -N/g SSV·d al final de los mismos.	Islas-Lima <i>et al.</i> , 2004

**Tabla 6.** (Continuación).

AFE	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> y NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Se utilizó un sedimento de un canal en Twentekanaal, Holanda, y después de 16 meses de incubación, se degradó una concentración de 6 μM de metano en un periodo de 20 horas, mientras que las concentraciones de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> y NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> disminuyeron a la par con el CH <sub>4</sub> . Por medio de biología molecular se encontró que la bacteria que degradaba el metano pertenecía al grupo ANME-2.	Raghoebarsing <i>et al.</i> , 2006
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> y NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Se inoculó un biorreactor con un cultivo enriquecido durante 15 meses, que inicialmente contenía una arqueobacteria ( <i>Methanosarcinales</i> ) y una bacteria desnitrificante (NC10) y se observó que conforme transcurría el tiempo, la arqueobacteria iba disminuyendo su población, hasta que desapareció por completo. El NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> prevaleció como aceptor de electrones sobre el NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> . Después del periodo de adaptación se logró una degradación de metano de 0.39 mM en 36 horas.	Ettwig <i>et al.</i> , 2008
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Tres distintos sedimentos se incubaron durante 6 meses, se observó una relación estequiométrica de 1:1 entre oxidación de metano y sulfato-reducción. Mediante la utilización de <sup>13</sup> CH <sub>4</sub> y técnicas de biología molecular, se observó que una cantidad considerable de carbono fue utilizada para la generación de arqueobacterias.	Wegener <i>et al.</i> , 2008
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Se extrajeron bacterias ANME-1 y ANME-2 de sedimentos del mar negro y se observó que contenían proteínas similares a la metil coenzima M reductasa. Se encontraron dos cofactores con níquel, una con la misma masa que el cofactor F <sub>430</sub> (905 Da) y otra con una masa relativamente mayor (951 Da). Lo que propone que existen enzimas similares con diferentes cofactores que son capaces de oxidar el metano, debido a que los sedimentos donde se han investigado provienen de lugares distintos y con condiciones diferentes.	Mayr <i>et al.</i> , 2008
Fe(III) y Mn(IV)	Un sedimento marino de la cuenca del río Eel, California, degradó anaeróticamente metano con birnesita (14 μmoles/año·cm <sup>3</sup> <sub>sed</sub> ) y ferrihidrita (6 μmoles/año·cm <sup>3</sup> <sub>sed</sub> ), después de 7 y 5 meses, respectivamente. La reducción de Fe(III) y Mn(IV) no se presenta debido a la dificultad del proceso.	Beal <i>et al.</i> , 2009

Donde: NO<sub>3</sub><sup>-</sup> – Nitrito; NO<sub>2</sub><sup>-</sup> – Nitrito; CH<sub>4</sub> – Metano; SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> – Sulfato; ANME – Bacterias anaerobias metanotróficas; AFE – Aceptor final de electrones; Da – Dalton; Fe(III) – Hierro; Mn (IV) – Manganeso; SSV – Sólidos suspendidos volátiles; kPa – Kilo pascales; N – Nitrógeno.

### 2.4.1.3. Termodinámica de la reacción

En la tabla 7 se muestran los valores de  $\Delta G^0$  calculadas bajo condiciones estándares (25° C y 1 atmósfera de presión) para los distintos aceptores de electrones que se pueden encontrar en ambientes naturales, así como para un compuesto modelo del humus (AQDS). La biodegradación de metano es termodinámicamente viable con los distintos aceptores de electrones, siendo la reacción con  $\text{SO}_4^{2-}$  con la que los microorganismos obtienen una menor cantidad de energía, mientras que el  $\text{NO}_2^-$  proporciona la mayor cantidad de energía, con el AQDS se obtiene un valor ligeramente mayor que con el  $\text{SO}_4^{2-}$ . Por lo tanto, en un ambiente natural donde existieran concentraciones adecuadas de los distintos aceptores de electrones y los microorganismos adecuados para su reducción, primero se utilizaría  $\text{NO}_2^-$ , posteriormente,  $\text{NO}_3^-$ , Mn(IV), Fe(III), AQDS y finalmente  $\text{SO}_4^{2-}$ .

**Tabla 7.** Comparación termodinámica para la biodegradación de metano con diversos aceptores de electrones.

AFE	REACCIÓN	$\Delta G^0$ (kJ/mol $\text{CH}_4$ )
$\text{NO}_2^-$	$3\text{CH}_4 + 8\text{NO}_2^- + 8\text{H}^+ \rightarrow 3\text{CO}_2 + 4\text{N}_2 + 10\text{H}_2\text{O}$	-928
$\text{NO}_3^-$	$5\text{CH}_4 + 8\text{NO}_3^- + 8\text{H}^+ \rightarrow 5\text{CO}_2 + 4\text{N}_2 + 14\text{H}_2\text{O}$	-765
$\text{Mn}^{4+}$	$\text{CH}_4 + 4\text{MnO}_2 + 7\text{H}^+ \rightarrow \text{HCO}_3^- + 4\text{Mn}^{2+} + 5\text{H}_2\text{O}$	-556
$\text{Fe}^{3+}$	$\text{CH}_4 + 8\text{Fe}(\text{OH})_3 + 15\text{H}^+ \rightarrow \text{HCO}_3^- + 8\text{Fe}^{2+} + 21\text{H}_2\text{O}$	-270.3
AQDS	$\text{CH}_4 + 4\text{AQDS} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 4\text{AH}_2\text{QDS}$	-46.3
$\text{SO}_4^{2-}$	$\text{CH}_4 + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{HS}^- + \text{H}_2\text{O}$	-25.4

Donde:  $\Delta G^0$  – Energía libre de Gibbs; AFE – Aceptor final de electrones.

Existe basta evidencia de que la biodegradación de metano acoplada a la sulfato-reducción es posible, a pesar de que los microorganismos obtengan poca energía del proceso (-25.4 KJ/mol  $\text{CH}_4$ ), y comparada con la cantidad de energía

que se puede obtener con el AQDS, la reacción es termodinámicamente más favorable con este último (Widdel *et al.*, 2006).

Hasta el momento, no existen estudios sobre degradación de metano, utilizando sustancias húmicas como aceptores finales de electrones y su estudio es de gran interés, ya que estas se encuentran distribuidos en distintos ambientes naturales como acuíferos, lagunas, sedimentos, y pudieran funcionar como aceptores de electrones en la oxidación de metano, en sitios donde el  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{SO}_4^{2-}$  no estén disponibles o se encuentren en muy bajas concentraciones.

#### **2.4.2. Benceno**

El benceno es un compuesto aromático (Figura 6), derivado del petróleo que se caracteriza por ser incoloro, ligeramente volátil, inflamable y soluble en agua. Es un componente importante de las gasolinas y se utiliza como disolvente de grasas, ceras, aceites, pinturas, en la extracción de aceites, en procesos de manufactura de detergentes, productos farmacéuticos, colorantes, entre otros (Hu *et al.*, 2006, Jahn *et al.*, 2005).

La contaminación de suelos y cuerpos de agua con benceno, se debe principalmente a fugas de gasolina en tanques de almacenamiento subterráneos y líneas de distribución, así como por derrames accidentales durante su producción y transporte, y su impacto ambiental es muy elevado, ya que su alta solubilidad y movilidad le permite migrar a través de los sistemas subterráneos. El agua que se utiliza para consumo humano, generalmente se obtiene de los acuíferos, por lo que la contaminación del agua subterránea con benceno es un problema de salud pública, debido a que es altamente tóxico y carcinogénico (Coates *et al.*, 2002, Hu *et al.*, 2006).

##### **2.4.2.1. Toxicidad**

El benceno es tóxico por todas las rutas de administración. La médula ósea es el principal órgano donde se expresa la hematotoxicidad e inmunotoxicidad que

induce el benceno. Dosemeci *et al.* (1996) determinaron que la toxicidad del benceno comienza a niveles de exposición en el rango de 5 – 19 ppm (Dosemeci *et al.*, 1996). (EPA, 2003).

La exposición crónica a bajas concentraciones de benceno puede producir disminuciones reversibles en el número de las células de la sangre. Por otro lado, exposiciones más crónicas ocasiona depresiones irreversibles en la médula ósea, caracterizadas por anemia, leucocitopenia, linfocitopenia, trombocitopenia y pancitopenia, siendo esta última en la que se presenta el mayor daño a la médula ósea, ya que disminuyen los tres tipos de células sanguíneas (leucocitos, linfocitos y trombocitos), a esta enfermedad se le denomina anemia aplásica (Akson *et al.*, 1971).

Existe evidencia de que la exposición a altas concentraciones de benceno produce efectos neurotóxicos en animales y humanos, mientras que no se han reportado efectos gastrointestinales por exposición oral, ni efectos pulmonares debido a la inhalación de sus vapores (EPA, 2003).

Estudios en distintas especies animales sobre los efectos de la inhalación del benceno, muestran que a concentraciones mayores a 150 mg/m<sup>3</sup> (47 ppm) el benceno es fetotóxico, ocasionando una pérdida de peso en el feto y/o variaciones en el esqueleto (EPA, 2003)

#### **2.4.2.2. Degradación de benceno**

Existen microorganismos aerobios que son capaces de oxidar benceno a CO<sub>2</sub> de manera rápida, pero el benceno difícilmente se encuentra en condiciones óxicas. Muchos de los sitios contaminados con benceno y/o otros hidrocarburos, se vuelven anaerobios como consecuencia de las altas concentraciones del contaminante, el agotamiento del oxígeno disponible y los procesos de biodegradación microbiana, por lo que la presencia de otros aceptores de electrones juega un papel importante en la biorremediación de los mismos. Existen compuestos como nitrato, sulfato y CO<sub>2</sub>, al igual que óxidos de Fe(III) y Mn(IV) que se pueden utilizar como aceptores de electrones (Lovley, 2000).

Lovley *et al.* (1995) estudiaron la capacidad de un sedimento obtenido de un acuífero contaminado con petróleo para oxidar metano utilizando Fe(III) como aceptor de electrones, observaron que al agregar ácido nitrilotriacético (ANT) se degradó una concentración de 10 µM de benceno en 68 días, mientras que en ausencia de éste, el benceno no mostró degradación alguna, esto debido a que la adición del ANT confirió mayor solubilidad al Fe(III) haciéndolo más biodisponible para los microorganismos (Lovley *et al.*, 1995a).

En este mismo estudio se agregaron sustancias húmicas como agente quelante y mostraron una degradación de benceno de 10 µM en un periodo de 62 días. Este descubrimiento fue de gran impacto, ya que se podía pensar en las sustancias húmicas como una alternativa para la biorremediación *in situ* de sitios contaminados con benceno, sin generar un impacto ambiental negativo y sin agregar compuestos externos (Lovley *et al.*, 1995a).

En la tabla 8 se muestran algunos estudios sobre la oxidación de benceno utilizando diferentes aceptores de electrones.

**Tabla 8.** Estudios de oxidación anaerobia de benceno con diferentes aceptores finales de electrones.

AFE	[C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> ] <sub>0</sub>	SEDIMENTO	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	120 µM	Bahía de California, USA.	La degradación de benceno comenzó después de 30 días y una concentración de 40 µM se degradó en 70 días, se agregaron 120 µM más y se oxidaron en 40 días. 90% de [ <sup>14</sup> C]-C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> marcado se recuperó como <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> después de 31 días.	Edwards y Grbic-Galic, 1992
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1 µM	Bahía de San Diego, California, USA.	El benceno se oxidó a CO <sub>2</sub> en un periodo de 59 días, una vez que el SO <sub>4</sub> se agotó, la degradación se detuvo hasta que se agregó SO <sub>4</sub> nuevamente.	Lovley <i>et al.</i> , 1995b

**Tabla 8.** (Continuación).

AFE	[C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> ] <sub>0</sub>	SEDIMENTO	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
CO <sub>2</sub>	675 μM	Sedimento de acuífero de un parque nacional, Michigan, USA.	El 80% del [ <sup>14</sup> C]- C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> se convirtió en una mezcla de <sup>14</sup> CH <sub>4</sub> y <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> , 113% y 64% de los valores teóricos. Se observó que con una concentración de 675 μM de benceno, se produjeron 190 μM de CH <sub>4</sub> en 590 días.	Kazumi <i>et al.</i> , 1997
Fe(III)	58.2 mCi/mmol	Sedimentos de zonas contaminadas con petróleo de Bemidji, Minesota, USA.	Se mineralizó el 50 % del [ <sup>14</sup> C]- C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> a <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> en un periodo de 80 días, sin una fase de adaptación. Mediante técnicas de biología molecular se encontraron bacterias de la familia <i>Geobacteraceae</i> en el sedimento.	Anderson <i>et al.</i> , 1998
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	150 μM	Sedimentos contaminados de Ontario, Canadá	En 100 días el benceno se degradó, al igual que la concentración de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (5 mM) disminuyó a la par con el benceno. No se observó degradación en las muestras en ausencia de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> . 95% de [ <sup>14</sup> C]- C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> se recuperó como <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> .	Burland <i>et al.</i> , 1999
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	100 μM	Sedimento del río Potonac, Maryland, USA.	Dos cultivos puros de <i>Dechloromonas</i> (cepas JJ y RCB) fueron capaces de oxidar el benceno hasta CO <sub>2</sub> . El NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> se redujo hasta N <sub>2</sub> .	Coates <i>et al.</i> , 2001
Fe(III), Mn(IV)	5 μM	Sedimento del río Rhine, Wageningen, Holanda.	El 93% del benceno con Mn(IV) se oxidó a CO <sub>2</sub> en 80 días, y una segunda alimentación en 120 días, mientras que con Fe(III), el 85% ocurrió en un periodo de 710 días, y la segunda alimentación en 125 días.	Villatoro-Monzón <i>et al.</i> , 2008
AQDS	5 mM	Cultivo líquido estable	El cultivo después de varios ciclos de degradación de MTBE, fue capaz de degradar una concentración de 2 mM de benceno en ausencia de MTBE.	Wei y Finneran, 2009

Donde: AFE – Aceptor final de electrones; Fe – Hierro; Mn – Manganeseo; SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> – Sulfato; NO<sub>3</sub><sup>-</sup> – Nitrato; CH<sub>4</sub> – Metano; CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono y C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> – Benceno.

La degradación anaerobia de benceno puede llevarse a cabo con una amplia gama de aceptores de electrones, pero no existe información suficiente sobre la capacidad de las sustancias húmicas como aceptores de electrones.

### **2.4.3. Naftaleno**

El naftaleno es un compuesto orgánico bicíclico (Figura 6) que está clasificado dentro de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). Los HAPs son hidrocarburos aromáticos formados naturalmente y se caracterizan por tener una baja solubilidad. El estudio de su degradación es de gran interés debido a que son altamente tóxicos y carcinogénicos. Los HAPs se forman por la combustión incompleta de la materia orgánica tanto de forma natural como por la actividad antropogénica (Rittman y McCarty, 2001).

Una de las primeras observaciones de cáncer en humanos fue a finales del siglo XVIII en las personas que se dedican a limpiar chimeneas, debido al contacto con el hollín y los alquitranes, los cuales tienen alto contenido en HAPs, pero hoy en día, el riesgo de estar en contacto con ellos es aun mayor, debido a las concentraciones que se generan en procesos comerciales donde ocurre la combustión incompleta de carbón como en plantas de coque, plantas de obtención de gas natural y refinerías (Rittman y McCarty, 2001).

Industrialmente, el naftaleno se utiliza para la fabricación de resinas sintéticas, negro de humo, pólvora sin humo, colorantes, así como en la síntesis de químicos como anhídrido ftálico (Días y Portela, 1997).

#### **2.4.3.1. Degradación de naftaleno**

La prevalencia del naftaleno, así como de otros HAPs, en sedimentos contaminados es de particular interés, debido a que generalmente se encuentran en ambientes anaerobios, y se creía que en ausencia de oxígeno (condiciones aerobias), eran muy resistentes a la biodegradación (Meador *et al*, 1995).

En la tabla 9 se presenta una revisión bibliográfica de algunas investigaciones realizadas bajo condiciones anaerobias utilizando distintos aceptores de electrones.

**Tabla 9.** Estudios de oxidación anaerobia de naftaleno con diferentes aceptores finales de electrones.

AFE	[C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> ] <sub>0</sub>	SEDIMENTO	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	39 μM	Sedimento de acuífero	Después de 21 meses de adaptación, una serie de cultivos mostró periodos de degradación completa de naftaleno entre 1 semana y 5 meses, y en la segunda alimentación la degradación ocurrió en menor tiempo. En el cultivo que mostró un menor tiempo, se observó una mineralización de [ <sup>14</sup> C]-naftaleno a <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> en un periodo de 15 días	Bedessem <i>et al.</i> , 1997
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1mM	Sedimento de acuífero	Después de un periodo de adaptación de 8 semanas de la cepa pura NaphS2, se observó una disminución del 97% de C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> en un periodo de 57 días, así como una producción de sulfuro de 400 μmol. Mediante técnicas de biología molecular, se encontraron bacterias del grupo <i>Desulfobacteriaceae</i> ( <i>Desulfobacterium anilini</i> )	Galushko <i>et al.</i> , 1999
Fe(III)	18.6 mCi/ mmol	Sedimento marino contaminado con HAP con petróleo de Bemidji, Minesota, USA.	El 90% de [ <sup>14</sup> C]-naftaleno se oxidó a <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> en un periodo de 85 días, de la muestra obtenida a 71 m de distancia de la zona contaminada. No se observó fase de adaptación lo que sugiere que los μos estaban adaptados a este compuesto.	Anderson y Lovley, 1999

**Tabla 9.** (Continuación).

AFE	[C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> ] <sub>0</sub>	SEDIMENTO	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	15.6 μM	Sedimento de acuífero contaminado, Stuttgart, Alemania	Se observó una producción de azufre de 2.4 mM debido a la utilización del SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> como aceptor de electrones en la degradación de naftaleno. Se identificó al ácido 2-naftóico como intermediario en la degradación de naftaleno	Meckenstock <i>et al.</i> , 2000
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	150 μM	Lodo de reactor de lecho fluidizado (obtenido de sedimentos marinos contaminados con HPA.	2 cultivos puros aislados (NAP-4 y NAP-3-1), degradaron 33% y 22% de C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> , respectivamente, en un periodo de 18 días (después del periodo de adaptación). Las bacterias que se determinaron para NAP-4 fueron <i>Vibrio Pelagius</i> y para NAP-3-1 bacterias del grupo <i>Pseudomonadaceae</i> ( <i>P. stutzeri</i> y <i>P. aeruginosa</i> ).	Rockne <i>et al.</i> , 2000
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.6 μCi	Lodo de reactor de lecho fluidizado.	Después de 60 días el 17% de [ <sup>14</sup> C]-naftaleno se recuperó como <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> , y una parte considerable del [ <sup>14</sup> C] se obtuvo como biomasa.	Rockne y Strand, 2001

Donde: AFE – Aceptor final de electrones; Fe – Hierro; SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> – Sulfato; NO<sub>3</sub><sup>-</sup> – Nitrato; CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono; C<sub>10</sub>H<sub>8</sub> – Naftaleno; HPA – Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos y μos – microorganismos.

### III. JUSTIFICACIÓN

Los hidrocarburos son compuestos de gran utilidad en la vida diaria. A partir de ellos obtenemos energía y son base para la generación de varios productos de uso cotidiano. Sin embargo, su mal manejo puede causar la contaminación de cuerpos de agua, generando graves problemas ambientales y de salud, así como la liberación del metano al ambiente, incrementa el efecto invernadero y contribuye al calentamiento global.

Debido a que las sustancias húmicas se encuentran abundantemente en lugares como acuíferos, pantanos, lagos, humedales, sedimentos marinos, al igual que estos sitios albergan grandes comunidades microbianas capaces de reducirlas, y existe evidencia de que pueden funcionar como aceptores finales de electrones en la biodegradación de una gran variedad de contaminantes, incluyendo hidrocarburos, las sustancias húmicas pueden considerarse como una alternativa ecológicamente viable para la biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos.

Hasta el momento se conoce muy poco acerca del papel que juegan las sustancias húmicas en la biodegradación de hidrocarburos y se pretende que la información que se obtenga de este trabajo sea importante para que en un futuro pueda aplicarse a la biorremediación de sitios contaminados, así como a la disminución de la concentración de metano que es liberada al ambiente.

## **IV. HIPÓTESIS**

Los microorganismos que se encuentran en los diferentes sedimentos estudiados, son capaces de degradar anaeróbicamente hidrocarburos, utilizando sustancias húmicas como aceptores finales de electrones.

## **V. OBJETIVOS**

### **5.1. GENERAL**

Evaluar la capacidad de 3 diferentes inóculos para oxidar anaeróbicamente benceno, naftaleno y metano, utilizando diferentes aceptores finales de electrones.

### **5.2. ESPECÍFICOS**

- a) Determinar la capacidad y eficiencia de los inóculos para oxidar benceno, naftaleno y metano, en presencia de AQDS, nitrato y sulfato, como aceptor final de electrones.
  
- b) Evaluar la capacidad y eficiencia de los inóculos para oxidar metano en presencia de óxidos de Fe(III) y Mn(IV) como aceptores finales de electrones y el impacto de las sustancias húmicas en la transferencia de electrones.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. MATERIALES

#### 6.1.1. Inóculos

Se utilizaron 3 distintos inóculos para la realización de este estudio.

INÓCULO UAM.- Suelo contaminado con hidrocarburos obtenido por un grupo de investigadores de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa, pero debido a motivos de confidencialidad, no se tiene información del sitio de donde fue tomado.

INÓCULO POZA RICA.- Suelo obtenido de una zona contaminada con hidrocarburos cercana a Poza Rica, Veracruz.

INÓCULO ÉBANO.- Sedimento obtenido de la laguna Marland ubicada en la ciudad de Ébano, San Luis Potosí. Esta laguna fue de interés debido a que en el cerro de La pez (cercano a la laguna Marland) se situó el primer pozo petrolero del país, siendo la primera perforación el 3 de abril de 1904.

En la tabla 10 se enlista la caracterización de los 3 diferentes sedimentos.

**Tabla 10.** Caracterización de los inóculos.

Inóculo	%ST	%SV	%SF
UAM	86.94	11.47	74.97
Poza Rica	84.03	12.4	71.63
Ébano	13.61	1.97	11.63

Donde: ST – sólidos totales; SV – Sólidos volátiles; SF – Sólidos fijos.

### 6.1.2. Medio basal

El medio basal utilizado en los experimentos en lote se preparó siguiendo la metodología descrita en Cervantes *et al.* (2000) con algunas modificaciones, el cual contiene (g/L): NaHCO<sub>3</sub> (5), NH<sub>4</sub>Cl (0.3), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.2), MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (0.03), CaCl<sub>2</sub> (0.1), Na<sub>2</sub>S (0.1) y 1 ml/L de elementos traza. La solución de elementos traza contiene (mg/L): FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (2000), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (50), ZnCl<sub>2</sub> (50), CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (38), MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (500), (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> (50), AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (90), CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (2000), NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (920), Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O (162), EDTA (1000), 1 ml/L HCl (36%). El pH del medio se controló a 7.2 ± 0.2 debido al bicarbonato adicionado y a la composición del espacio de cabeza de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80%/20%) (Cervantes *et al.*, 2000a).

## 6.2. MÉTODOS

### 6.2.1. Síntesis de óxidos de Fe(III) y Mn(IV)

#### 6.2.1.1. Goetita (FeOOH)

Se agregaron 200 mL de KOH 2.5 N a 50 g de Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O diluidos en 825 mL de agua bi-distilada, la solución se ajustó a pH 12 con un potenciómetro marca Thermo, modelo Orion 4 star, se cubrió para evitar su evaporación y se dejó reposar por 24 horas a 60° C en un horno de secado marca Riossa, modelo H-33. La suspensión se lavó varias veces para remover las sales (Atkinson *et al.*, 1967).

#### 6.2.1.2. Vernadita (MnO<sub>2</sub>)

Se disolvieron 5.55 g de MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O en 27.8 mL y 2.96 g de KMnO<sub>4</sub> en 74.1 mL de agua destilada. La solución de KMnO<sub>4</sub> se llevó a una temperatura de 90° C con agitación constante, en una placa de calentamiento marca Barnstead Thermolyne, modelo SP131635. Una vez alcanzada la temperatura, se agregaron 3.71 mL de NaOH 5N, y posteriormente, la solución de MnCl<sub>2</sub> de forma lenta a

temperatura controlada (90° C). Se mantuvo en agitación constante durante 30 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Finalmente, la suspensión se lavó varias veces con agua destilada (Bell *et al.*, 1987).

## **6.2.2. Experimentos en lote para la biodegradación de metano**

### **6.2.2.1. Incubación**

Se agregaron 60 mL del medio basal descrito anteriormente en botellas serológicas de 120 mL, y se inocularon con 10 g/L de ST; posteriormente, las botellas se sellaron utilizando tapones de caucho y arillos de aluminio. Se establecieron condiciones anaerobias intercambiando la atmósfera del espacio de cabeza con una mezcla de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80%/20%) durante 5 minutos. Se incubaron 12 botellas, para cada uno de los 3 sedimentos, con AQDS (5 mM) como aceptor final de electrones, así como 3 botellas como control endógeno (inóculo + aceptor de electrones), 3 botellas como control abiótico o estéril (inóculo estéril + aceptor de electrones + contaminante), y 3 botellas como control sin aceptor de electrones (inóculo + contaminante, sin AQDS).

Se realizaron distintos tratamientos como se describe a continuación

**Primer ciclo.-** Se agregaron 6.82 mM (10mL) de metano inicialmente en cada botella y después de 49 días se agregaron 20.46 mM (30mL) adicionales en las botellas con el inóculo Ébano.

**Segundo y Tercer ciclo.-** Se extrajo el medio basal de las botellas y se agregó nuevo medio basal fresco con las mismas condiciones descritas anteriormente y se agregaron 20.46 mM (30 mL) de metano.

**Atmósfera de CH<sub>4</sub>.**- Posterior al tercer ciclo, se extrajo el medio basal y se preparó uno nuevo con las mismas características descritas anteriormente con ausencia de NaHCO<sub>3</sub> y una mezcla de fosfatos para generar la capacidad buffer de la solución, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (30mM) y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (30mM), así como 3mL/L de elementos traza. Se intercambió el espacio de cabeza con la mezcla de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80%/20%)

durante 5 minutos, y finalmente con metano puro. La concentración de AQDS fue de 20 mM y la de metano fue de 20.48 mM.

**Cuarto ciclo.-** Nuevamente se cambió el medio basal y se agregaron 3.41 mM (5 mL) de metano.

**Transferencia de sedimento.-** Una vez transcurridos 140 días (2 ciclos), se tomó una alícuota del inóculo (10% v/v) de las botellas y se incubaron nuevas botellas utilizando el mismo medio basal, con una concentración de 20.46 mM de metano.

**Incubaciones con Nitrato y Sulfato.-** Para el inóculo Ébano se incubaron 5 botellas con  $\text{NO}_3^-$  (5 mM) y  $\text{SO}_4^{2-}$  (3 mM) como aceptores de electrones incluyendo 20.46 mM de metano (30 mL), así como 3 botellas como control abiótico o estéril (inóculo estéril + aceptor de electrones + metano).

**Incubaciones con óxidos de Fe (III) y Mn (IV).-** Para el inóculo Ébano se incubaron diferentes botellas con Goetita ( $\text{FeOOH}$  10 mM) y Vernadita ( $\text{MnO}_2$  10 mM), así como una concentración de ácidos húmicos de 50 mg C/L. Los ácidos húmicos fueron extraídos de una leonardita comercial, obtenida de un perfil húmico de minas de carbón del estado de Coahuila. Se realizaron diversos tratamientos por triplicado.

- a) Inóculo +  $\text{CH}_4$
- b) Inóculo +  $\text{CH}_4$  + Fe(III)
- c) Inóculo +  $\text{CH}_4$  + Mn(IV)
- d) Inóculo +  $\text{CH}_4$  + Fe (III) + Ácidos Húmicos
- e) Inóculo +  $\text{CH}_4$  + Mn(IV) + Ácidos Húmicos
- f) Inóculo +  $\text{CH}_4$  + Fe (III) + Ácidos Húmicos (Estéril)
- g) Inóculo +  $\text{CH}_4$  + Mn(IV) + Ácidos Húmicos (Estéril)
- h) Inóculo +  $\text{CH}_4$  + Ácidos Húmicos
- i) Inóculo +  $\text{CH}_4$  + Ácidos Húmicos (Estéril)

Los tratamientos se incubaron a 25° C en una incubadora orbital marca Eseeve, modelo INO 650V-7, a una velocidad de 140-150 rpm. Los controles abióticos se prepararon de la misma manera, y se esterilizaron 2 veces utilizando

un autoclave marca Yamato, modelo SM510, a 121° C por 30 minutos, antes de agregar el contaminante.

### **6.2.3. Experimentos en lote para la biodegradación de benceno y naftaleno**

#### **6.2.3.1. Incubación**

##### **6.2.3.1.1. Tratamientos con AQDS**

La preparación de las botellas para la degradación de benceno y naftaleno se realizó de la misma manera que para el metano. Se agregaron 60 mL del medio basal en botellas serológicas de 120 mL, AQDS (5 mM) como aceptor final de electrones, se inocularon con 10 g/L de ST de cada uno de los inóculos, se sellaron con tapones de teflón y arillos metálicos, y finalmente, se establecieron condiciones anaerobias con una mezcla N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80%/20%).

Para cada inóculo y cada contaminante, se incubaron 12 botellas con AQDS (5 mM) como aceptor final de electrones, así como 3 botellas para cada uno de los controles experimentales (endógeno, estéril y sin aceptor de electrones). Finalmente, se agregaron los contaminantes a oxidar, benceno (50 μM) y naftaleno 38.33 μM. Para el caso particular del benceno con el inóculo Ébano, después de 4 meses, se extrajo el medio basal de las botellas y se agregó nuevo medio basal fresco con las mismas condiciones descritas anteriormente y se agregó nuevamente la misma concentración de benceno para iniciar un nuevo ciclo de degradación.

Los tratamientos se mantuvieron en un cuarto a 28° C con agitación manual vigorosa 2 veces al día.

##### **6.2.3.1.2. Tratamientos con ácidos húmicos**

Una vez concluidos los estudios de degradación con AQDS como aceptor de electrones para benceno con el inóculo Poza Rica y Ébano, los sedimentos se

lavaron con medio basal y se centrifugaron, se colocaron en botellas serológicas de 60 mL y se rellenaron con 25 mL del medio basal descrito anteriormente, y una concentración de ácidos húmicos de 5 g/L como aceptor final de electrones. De igual forma, se establecieron condiciones anaerobias y finalmente, se agregó una concentración de benceno de 50  $\mu$ M.

### **6.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS**

#### **6.3.1. Reducción de AQDS**

Los electrones transferidos a la AQDS se cuantificaron por el método modificado descrito por Lovley *et al.* (1996). Se colectaron muestras de 1 ml en una cámara anaerobia con una atmósfera compuesta por  $N_2/H_2$  (95%/5%), se centrifugaron utilizando una centrífuga Spectrafuge, modelo 16M a una velocidad de 16,000 *g* durante 10 minutos y se midió la absorbancia a 450 nm en un Espectrofotómetro marca Thermo Scientific, modelo Genesys 10 UV. Se realizó una curva de calibración utilizando una solución de AQDS (1mM), la cual se redujo agregando ditionita de sodio 0.1 M. Se utilizó buffer de  $NaHCO_3$  (60 mM) como agente diluyente y blanco.

#### **6.3.2. Concentración de metano**

La concentración de metano se determinó inyectando una alícuota de 100  $\mu$ L del espacio de cabeza de las muestras, en un Cromatógrafo de Gases marca Agilent Technologies, modelo 6890N. Se utilizó un detector de conductividad térmica y una columna de acero inoxidable Hayesep D 100/120, Altech, USA. El gas acarreador fue nitrógeno con un flujo de 12.9 mL/min. La temperatura del inyector, horno y detector fueron de 250° C, 60° C y 300° C, respectivamente.

### **6.3.3. Concentración de benceno**

Para determinar la concentración de benceno se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  del espacio de cabeza de las muestras y se inyectó en un Cromatógrafo de Gases marca Agilent Technologies, modelo 6890N. Se utilizó un detector de ionización de flama y una columna capilar DB-624. El gas acarreador fue nitrógeno con un flujo de 25 mL/min. La temperatura del inyector, horno y detector fueron de 230° C, 60° C y 230° C, respectivamente.

### **6.3.4. Concentración de naftaleno**

La extracción de naftaleno se realizó según la metodología descrita por Rockne *et al.* (2000). Se extrajo 1 mL de las muestras y se agregó 1 mL de hexano en tubos de precipitado, se agitaron vigorosamente durante 5 min con un vortex marca Scientific Industries, modelo SI-T236, se dejaron en reposo por 12 horas y finalmente, el hexano se colocó en viales para HPLC de 2 mL (Rockne *et al.*, 2000).

Para el análisis de Naftaleno, se utilizó el sistema cromatográfico para muestras líquidas (HPLC) marca Agilent Technologies, modelo 1200 series, que consiste de un desgasificador por vacío en línea, una bomba cuaternaria, un inyector automático con una válvula Rheodyne de 6-puertos con una capacidad de inyección de 20  $\mu\text{L}$ , un horno para columnas y dos detectores en línea (arreglo de diodos -DAD- y de fluorescencia -FLD-) conectado a una computadora para la adquisición de datos mediante el software HP Chemstation. También se utilizó una columna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 x 4.6 mm de diámetro interno y 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula), a una temperatura constante de 30° C, una fase móvil isocrática 90:10 (MeOH:H<sub>2</sub>O, 90:10, vol:vol) a un flujo de 1 mL/min y un detector de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 260 nm y emisión 350 nm. Bajo estas condiciones, el tiempo de retención del Naftaleno es de 2.55 min.

### **6.3.5. Concentración de sulfato y nitrato**

La determinación de sulfato y nitrato se realizó en un sistema de Electroforesis Capilar marca Agilent Series, modelo G1600A, con detector de arreglo de diodos (DAD) (190-600nm). La muestra se centrifugó a 6708 g durante 5 minutos y se filtró con una membrana de 0.2  $\mu\text{m}$ .

Se utilizó una columna G1600-62211 con un capilar de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro interno y 72 cm de longitud.

Para el sulfato, la muestra se inyectó con una presión de 50 mbar por 6 segundos, se aplicó un voltaje de -30 kV, la temperatura del capilar fue de 15° C y se utilizó un buffer de Bromuro de hexadeciltrimetilamonio 5 mM y ácido piridincarboxílico 25 mM. La señal se detectó a 350 nm con detección indirecta de UV con una referencia de 230 nm. La señal que corresponde al sulfato, se obtuvo entre el minuto 4 y 5. Mientras que para el nitrato, la muestra se inyectó con la misma presión y el mismo voltaje por 8 segundos, la temperatura del capilar fue de 20° C y se utilizó un buffer para aniones inorgánicos (Agilent 8500-6797). La señal se detectó a 350 nm con detección indirecta de UV con una referencia de 245 nm. La señal que corresponde al nitrato, se obtuvo entre el minuto 8 y 9.

### **6.3.6. Concentración de Fe (II) y capacidad de transferencia de electrones**

Para cuantificar la concentración de Fe(II), así como la capacidad de transferencia de electrones, se utilizó el método de la ferrozina (Stookey, 1970).

Se preparó una solución para la cual se agregaron 0.02% de ferrozina en 1 L de buffer HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetano-sulfónico) (p/v), ajustado a pH 7. Se agregaron 4.8 mL de esta solución en tubos de precipitado. Para la concentración de Fe(III), se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de las muestras en 200 mL de HCl 0.5 N, y se dejaron reposar durante 30 min. Se tomaron alícuotas de 200 mL y se colocaron en los tubos con la ferrozina, e inmediatamente se midieron en un espectrofotómetro marca Thermo Spectronic, modelo AQA 105126, a 562 nm. La curva de calibración de Fe(II) se generó utilizando  $\text{FeCl}_2$ . Para cuantificar la

capacidad de transferencia de electrones, se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de Citrato Férrico 20 mM ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7$ ) a 100  $\mu\text{L}$  de muestra, se dejaron reposar durante 15 minutos, y se continuaron los pasos descritos previamente.

La curva de calibración se realizó utilizando  $\text{FeCl}_2$ .

## **VII. RESULTADOS**

### **7.1. EXPERIMENTOS DE OXIDACIÓN ANAEROBIA CON EL INÓCULO UAM**

Las botellas inoculadas con este consorcio para los tres contaminantes estudiados, se dejaron en incubación por 3 meses y no se observó una disminución en la concentración de metano, benceno y naftaleno, así como un aumento en la concentración de AH<sub>2</sub>QDS, por lo que se decidió detener los experimentos con este inóculo.

### **7.2. EXPERIMENTOS DE OXIDACIÓN ANAEROBIA CON EL INÓCULO POZA RICA**

#### **7.2.1. Oxidación anaerobia de metano**

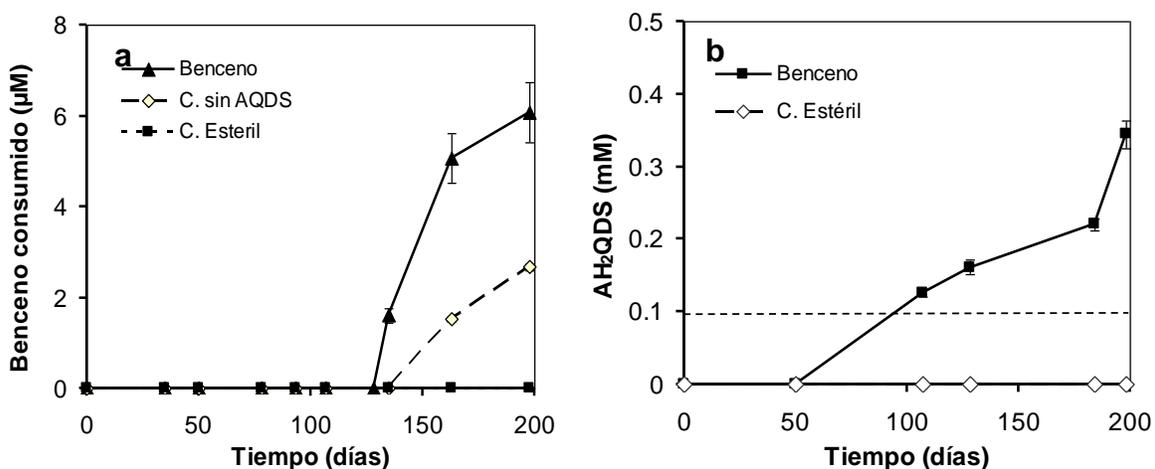
La cinética de degradación de metano con el inóculo Poza Rica, se corrió durante 270 días, en los cuales no se observó consumo de metano, tanto en las muestras como en los controles estériles y sin AQDS. Mientras que la concentración de AH<sub>2</sub>QDS fue mayor en el control endógeno que en las muestras que contenían metano, por lo que se decidió parar ambas mediciones.

#### **7.2.2. Oxidación anaerobia de benceno**

##### **7.2.2.1. Tratamientos con AQDS como aceptor final de electrones**

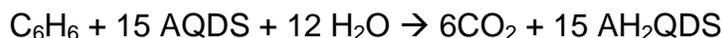
En la figura 8 se presenta la concentración de benceno consumido, así como la reducción de AQDS. En los primeros 4 meses del experimento no hubo degradación de benceno, sólo se observó el proceso de adsorción del mismo sobre el inóculo, que representó el 60% de la cantidad originalmente adicionada a los cultivos en este periodo de tiempo. A partir del día 128 se observó consumo de benceno, tanto en las muestras incluyendo AQDS, así como en el control sin AQDS, con una concentración de consumo al día 198 de 6 µM y 2.67 µM,

respectivamente (Figura 8 a). El AQDS comenzó a reducirse a partir del día 50 hasta llegar a un valor final de 0.34 mM (Figura 8 b).



**Figura 8.** a) Consumo de Benceno por el inóculo Poza Rica. Valores corregidos por el control estéril. b) Concentración de AH<sub>2</sub>QDS. Valores corregidos por el control endógeno. Los resultados son las medias de 12 incubaciones para el tratamiento con el contaminante y de 3 muestras para ambos controles. Las barras representan la desviación estándar. La línea punteada representa el valor teórico esperado de AH<sub>2</sub>QDS necesario para oxidar la concentración de benceno reportada en la gráfica a.

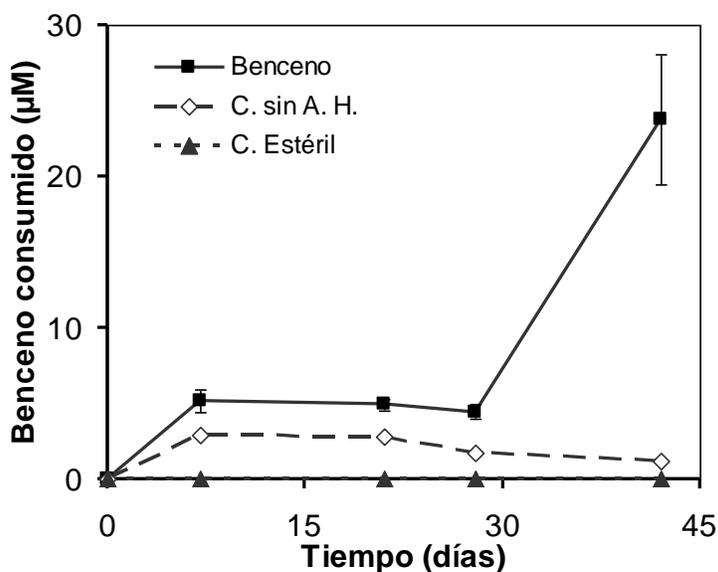
Según la siguiente reacción:



la estequiometría teórica es de 1 mol de C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> por 15 de AH<sub>2</sub>QDS (relación 1:15), mientras que la obtenida en las incubaciones fue de 1:56. El porcentaje de degradación fue del 15% con respecto a la concentración inicial de benceno y a su vez, corregida por la cantidad adsorbida en el control estéril. Por otra parte, se tiene un exceso de AH<sub>2</sub>QDS de 0.25 mM (370%), ya que según la reacción anterior, la cantidad de AH<sub>2</sub>QDS teórica es de 0.09 mM.

### 7.2.3.2. Tratamientos con ácidos húmicos como aceptor final de electrones

Una vez concluido el tratamiento de degradación de benceno con AQDS como aceptor final de electrones, se estudió el efecto de los ácidos húmicos como aceptores finales de electrones. El experimento se corrió durante 50 días y no se logró documentar la reducción de éstos; sin embargo, existen indicios de que el benceno fue consumido por los microorganismos reductores del humus en este inóculo. En la figura 9, se puede observar el consumo de benceno desde el inicio del experimento, al día 7 se cuantificó una concentración de 5  $\mu\text{M}$  y se mantuvo constante hasta el día 28, pero a partir del día 29 la utilización de benceno incrementó hasta llegar a una concentración final de 23.7  $\mu\text{M}$ . El control sin ácidos húmicos mostró una concentración de consumo entre 1 y 3  $\mu\text{M}$  a lo largo del experimento, mientras que no se observaron cambios en el control estéril (Figura 9).



**Figura 9.** Consumo de Benceno por el inóculo Poza Rica y ácidos húmicos como aceptores finales de electrones. Valores corregidos por el control estéril. Los resultados son las medias de 6 incubaciones para el tratamiento con el contaminante y de 3 muestras para ambos controles. Las barras representan la desviación estándar.

### **7.2.3. Oxidación anaerobia de naftaleno**

Por su parte, el experimento de degradación de naftaleno se llevó a cabo durante 6 meses, en los cuales se estuvieron monitoreando periódicamente la concentración de benceno y del aceptor de electrones (AQDS), pero no fue evidente una disminución en su concentración, así como no se observaron cambios en la concentración de AH<sub>2</sub>QDS, tanto en las muestras como en los controles.

## **7.3. EXPERIMENTOS DE OXIDACIÓN ANAEROBIA CON EL INÓCULO ÉBANO**

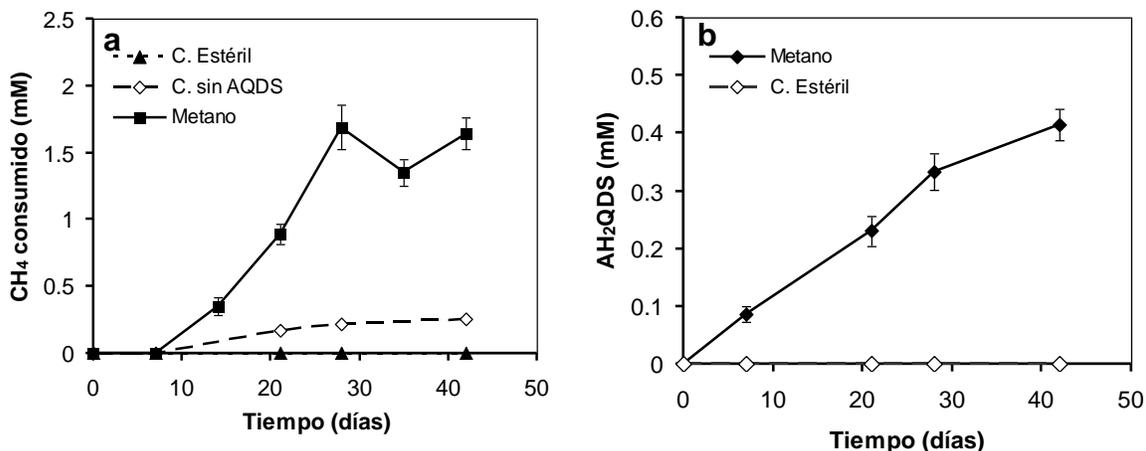
### **7.3.1. Oxidación anaerobia de metano**

#### **7.3.1.1. Ciclos de oxidación**

##### **Primer ciclo de oxidación anaerobia de metano**

En la figura 10 se muestra el primer ciclo de degradación de metano para el inóculo Ébano, así como la concentración del aceptor final de electrones reducido (AH<sub>2</sub>QDS). A partir del día 7 se observó un consumo de metano en las muestras, hasta llegar a una concentración final de 1.5 mM (Figura 10 a), lo cual representa un porcentaje de degradación del 19% con respecto a la concentración inicial de metano. Se puede observar que en el día 28 se alcanzó el máximo valor de utilización (1.7 mM). El control sin AQDS mostró una concentración de consumo 6 veces menor a la de las muestras (0.26 mM) (Figura 10 b), mientras que el control estéril no mostró consumo de metano.

Por otro lado, la concentración de la quinona reducida (AH<sub>2</sub>QDS) se incrementó conforme transcurrió el tiempo de incubación, hasta llegar a un valor de 0.41 mM en el día 42 (Figura 8 b), 14 veces menor a la esperada teóricamente (6 mM), los valores se encuentran corregidos por el control endógeno.



**Figura 10.** a) Consumo de metano por el inóculo Ébano para el primer ciclo de degradación. Valores corregidos por el control estéril. b) Concentración de AH<sub>2</sub>QDS. Valores corregidos por el control endógeno. Los resultados son las medias de 12 incubaciones para el tratamiento con el contaminante y de 3 muestras para ambos controles. Las barras representan la desviación estándar.

De acuerdo a la reacción de oxidación anaerobia de metano con AQDS como aceptor de electrones,



la estequiometría teórica es de 1 mol de CH<sub>4</sub> por 4 moles de AQDS para su completa oxidación a CO<sub>2</sub> (1:4), mientras que la relación estequiométrica derivada de los datos experimentales fue de 3.6:1. Corrigiendo los valores por el consumo de metano observado en el control sin AQDS, el valor de la relación sería de 3:1.

Después del primer ciclo, en el día 49, se adicionaron 30 mL de metano (20.46 mM) a cada uno de los tratamientos y se incubaron por 42 días. En las muestras con metano, el consumo inició a partir del día 56 (7 días después de agregarlo) y se observó una concentración de consumo de 3.4 mM así como un porcentaje de degradación del 18%. El control sin AQDS mostró una concentración de consumo de metano de 0.8 mM en el día 84 de incubación y esta disminuyó hasta no mostrar indicios de utilización al día 91. Para este ciclo, y

los consecuentes, no se pudo documentar la reducción de la AH<sub>2</sub>QDS, debido a la alta cantidad de sustrato endógeno que contiene el sedimento.

### **Segundo y Tercer ciclo de oxidación anaerobia de metano.**

En el día 105, se inició un nuevo ciclo de degradación (segundo ciclo), con medio fresco e incluyendo una concentración inicial de metano de 20.46 mM . Se cuantificó una concentración de consumo de 1.47 mM al día 140, con un porcentaje de degradación del 8.7%, mientras que en los controles no se observó degradación alguna.

El tercer ciclo se inició en el día 200 con las mismas condiciones que el segundo, y la concentración final de consumo de metano al día 235 fue de 2.5 mM, y un porcentaje de degradación del 10.8%.

En estos dos ciclos, no fue posible documentar la reducción del AQDS, ya que la concentración de AH<sub>2</sub>QDS fue muy similar a la cuantificada en el control endógeno.

### **Oxidación anaerobia de metano con atmósfera de CH<sub>4</sub>.**

En este experimento se cambiaron las condiciones del medio y se generó una atmósfera saturada de CH<sub>4</sub>. Se incubaron las botellas durante 50 días sin observar consumo de metano en alguno de los tratamientos, ni de reducción de AQDS tanto en las muestras como en el control endógeno.

### **Transferencia de sedimento.**

Después de 150 días de incubación, se tomó una alícuota de 5 mL del líquido, previamente agitado para obtener una mezcla homogénea, y se transfirieron a nuevas botellas con medio fresco, así como las mismas concentraciones de contaminante y AQDS, 20.46 mM y 5 mM, respectivamente, esto con la finalidad de disminuir la cantidad de sustrato endógeno del sedimento

y documentar la reducción del aceptor final de electrones. La biodegradación de metano en este experimento ocurrió mucho más lento que en los experimentos anteriores, debido a la menor cantidad de inóculo.

La utilización de metano por los microorganismos comenzó a partir del día 40, con una concentración de consumo de 1 mM después de 2 meses y finalmente de 2 mM a los 5 meses de incubación. Por otro lado, la concentración de AH<sub>2</sub>QDS al final del experimento, fue de 0.12 mM, corregida por el control endógeno, lo que sugiere que después de 8 meses, el inóculo aún contiene una gran cantidad de sustrato endógeno.

### **Oxidación anaerobia de metano con nitrato y sulfato como aceptores de electrones.**

En el tratamiento con nitrato como aceptor de electrones, no se mostró degradación de metano en todo el periodo de incubación (105 días), así como no se observó diferencia en la concentración de nitrato tanto en las muestras, como en los controles estériles.

La biodegradación de metano con sulfato como aceptor de electrones mostró resultados que sugieren la OAM bajo condiciones sulfato-reductoras, ya que se observó una disminución en la concentración de metano de 2.6 mM al día 105 de incubación. Sin embargo, no fue posible documentar la reducción de sulfato acoplada a este proceso, por lo que se requiere de más experimentos para corroborar la OAM bajo estas condiciones.

### **Oxidación anaerobia de metano con óxidos de Mn(IV) y Fe(III) como aceptores finales de electrones.**

Los experimentos en lote para la degradación de metano con sustancias húmicas como mediadores redox y óxidos de Fe(III) y Mn(IV) como aceptores finales de electrones no muestran disminución de la concentración de metano más

allá de lo observado en los controles estériles y sin aceptores de electrones, por lo que no se pudo comprobar la OAM bajo estas condiciones.

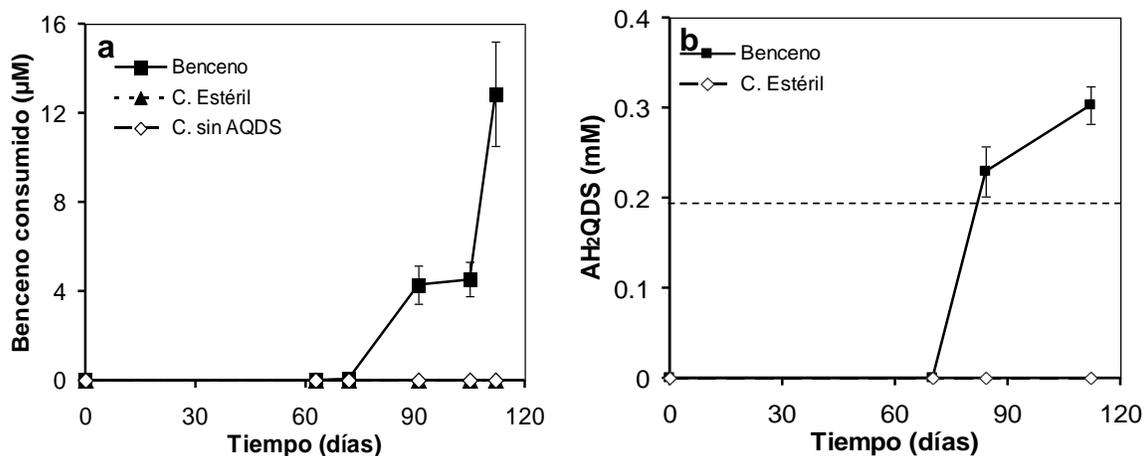
### **7.3.2. Oxidación anaerobia de benceno**

#### **7.3.2.1. AQDS como aceptor de electrones**

Se realizó un primer ciclo para el estudio de la biodegradación de benceno por un periodo de 120 días en el cual sólo se observó el efecto de adsorción del mismo sobre el inóculo, ya que las muestras y los controles, tanto estériles como sin AQDS, presentaron el mismo patrón (80% de adsorción).

La figura 11 muestra la degradación de benceno, así como la concentración del aceptor de electrones reducido ( $AH_2QDS$ ) con respecto al tiempo de un segundo ciclo de degradación. En los primeros 60 días se siguió observando el efecto de adsorción del benceno sobre el sedimento pero en una menor proporción (<5%). A partir del día 70, comenzó a observarse degradación de este en las muestras, se cuantificó una concentración de consumo de  $4.5 \mu M$  al día 105 de incubación, y en los días posteriores la velocidad fue mayor, reportando un consumo de  $12.8 \mu M$ . Ambos controles no mostraron cambios en la concentración de benceno. Por su parte, la concentración de AQDS reducido se mantuvo sin cambios hasta el día 70, y el valor final fue de  $0.3 \text{ mM}$  al día 112, 150% mayor al esperado para oxidar  $12.8 \mu M$  de benceno.

La relación estequiométrica fue de 1 mol de benceno por 23 del aceptor de electrones (1:23), y el porcentaje de degradación de benceno 27%. A pesar de que el valor estequiométrico está más aproximado al valor teórico esperado (1:15), esta relación no concuerda, al igual que en el experimento de degradación de benceno con el inóculo Poza Rica.



**Figura 11.** a) Consumo de Benceno por el inóculo Ébano. Valores corregidos por el control estéril. b) Concentración de AH<sub>2</sub>QDS. Valores corregidos por el control endógeno. Los resultados son las medias de 12 incubaciones para el tratamiento con el contaminante y de 3 muestras para ambos controles. Las barras representan la desviación estándar. La línea punteada representa el valor teórico esperado de AH<sub>2</sub>QDS necesario para oxidar la concentración de benceno reportada en la gráfica a.

### 7.3.3. Oxidación anaerobia de naftaleno

De la misma manera que con el sedimento 2, el experimento de degradación de naftaleno se llevó a cabo durante 6 meses, así como la cuantificación periódica de la concentración de naftaleno y del aceptor de electrones, sin cambios evidentes de la concentración de naftaleno y de la concentración de AH<sub>2</sub>QDS, en las muestras como en los controles, endógeno y sin AQDS.

## VIII. DISCUSIÓN

### 8.1. OXIDACIÓN ANAEROBIA DE METANO

La oxidación anaerobia de metano (OAM) es un proceso de suma importancia en el control de la liberación de gases de efecto invernadero. Es un proceso que ocurre naturalmente en el océano, y disminuye en un 90% la concentración de metano que se libera a la atmósfera (Reeburgh, W.S. 2007)

Este proceso está más estudiado en sedimentos marinos, con  $\text{SO}_4^{2-}$  como aceptor final de electrones (Boetius *et al.*, 2000, Lloyd *et al.*, 2006, Treude *et al.*, 2007, Krüger *et al.*, 2005, Thauer y Shima, 2006), y las primeras evidencias se obtuvieron de estudios geoquímicos, donde se observó que el metano que se generaba en sitios muy profundos desaparecía casi en su totalidad antes de llegar a la superficie, siendo el  $\text{SO}_4^{2-}$  el único aceptor de electrones disponible (Martens y Berner, 1974, Reeburg, 1976). Posteriormente, surgieron otros estudios con  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  (Raghoebarsing *et al.*, 2006, Ettwig *et al.*, 2008 y Modin *et al.*, 2007), así como recientemente se realizó una investigación con óxidos de Fe(III) y Mn(IV) (Beal *et al.*, 2009); sin embargo, en ninguno de estos se ha documentado la reducción del aceptor final de electrones. Islas-lima *et al.* (2004), en su estudio de biodegradación de metano con nitrato como aceptor final de electrones, obtuvieron una relación estequiométrica  $\text{NO}_3^-:\text{CH}_4$  de 2.5:1, cuando la real es de 1.6:1, siendo este el primer estudio en el que se documenta la oxidación del metano y la reducción del aceptor final de electrones.

Hasta el momento, no existen estudios donde se muestre la oxidación anaerobia de metano utilizando sustancias húmicas como aceptores finales de electrones. En este trabajo, se muestran indicios de que es posible su oxidación utilizando AQDS como aceptor final de electrones. Se realizaron diferentes experimentos, sin embargo, no fue posible empatar la estequiometría de la reducción de la AQDS con el consumo de metano que se cuantificó debido a que los controles mostraban la misma concentración de  $\text{AH}_2\text{QDS}$  que las muestras aunado a la gran cantidad de sustrato endógeno que contiene el inóculo Ébano, el

cual proviene de un sitio en el que en la actualidad se observan emanaciones de petróleo. En el experimento mostrado en la figura 10, se pudo observar una diferencia entre la cantidad de AH<sub>2</sub>QDS reducida entre los controles y las muestras; sin embargo, la estequiometría real (3:1) no se asemeja a la teórica (1:4), por lo que se requiere mantener activos los tratamientos durante un periodo más largo, hasta que se consuma en su totalidad el sustrato endógeno o bien utilizar otras técnicas que aceleren su consumo, sin afectar las condiciones anaerobias de los microorganismos.

Otras de las posibles explicaciones a las discrepancias en la estequiometría del experimento, es que el metano no se esté oxidando completamente hasta CO<sub>2</sub>, y la mayor parte de la concentración de metano consumida (93%) se esté bio-transformando hasta un intermediario de la ruta de la oxidación anaerobia de metano (como el acetato); así como que existieran en el inóculo otros aceptores de electrones como óxidos metálicos, ya que se encuentran naturalmente en suelos y sedimentos, y éstos pudieran estar re-oxidando la AH<sub>2</sub>QDS permitiendo de esta manera que fueran utilizados nuevamente por los microorganismos reductores del humus.

Los resultados de esta investigación son de suma importancia, debido a que se observa una disminución en la concentración de metano, aunado a una reducción de AQDS, que a pesar de que no se obtuvieron valores estequiométricos, son un indicio de que la oxidación anaerobia de metano con AQDS como aceptor final de electrones, es llevada a cabo por microorganismos que se encuentran en el inóculo Ébano.

Debido a la abundancia de sustancias húmicas en diferentes ambientes como suelos, sedimentos, lagos, pantanos, acuíferos, entre otros, es importante enfatizar que su participación como aceptor final de electrones en la OAM contribuiría significativamente a mitigar los efectos del metano como gas de efecto invernadero, ya que al ser consumido por microorganismos reductores de humus, sería transformado a CO<sub>2</sub> y el efecto sería 21 veces menos dañino para el planeta. Además, las sustancias húmicas podrían re-oxidarse con óxidos de hierro (III) y

manganeso (IV), mismos que se encuentran en estos sitios (Lovley *et al.*, 1996, Stone y Morgan, 1984).

Existe evidencia de que las sustancias húmicas contribuyen de distintas formas a reducir las emisiones de metano liberadas al ambiente. Por ejemplo, se ha observado que microorganismos metanogénicos, cuando tienen presente AQDS como aceptor final de electrones, prefieren la ruta de la oxidación anaerobia de sustratos acoplada a la reducción de quinonas, en lugar de la metanogénica (Cervantes *et al.*, 2002). También, Cervantes *et al.* (2008) realizaron un estudio de biodegradación de *p*-cresol y otros compuestos orgánicos, en presencia de diferentes aceptores de electrones, y observaron que cuando no se agregó ningún aceptor de electrones externo se produjo una concentración de metano de 1.4 miliequivalentes de electrones (meq)/L, mientras que al agregar AQDS como aceptor final de electrones, la generación de metano fue menor, (0.9 meq/L), y la concentración de AQDS reducida fue de 2.5 meq/L, disminuyendo la producción de metano en un 35% (Cervantes *et al.*, 2008). Por otro lado, bacterias metanogénicas, como *Methanospirillum hungatei* JF1, suprimen la producción de metano cuando tienen AQDS como aceptor de electrones (Cervantes *et al.*, 2002).

Por otra parte, se ha demostrado en diversos estudios que la oxidación anaerobia de metano ocurre con  $\text{SO}_4^{2-}$  como aceptor final de electrones (Treude *et al.*, 2007 y Krüger *et al.*, 2005) y que la energía libre de Gibbs es de -25.4 KJ/mol  $\text{CH}_4$ . El cálculo de  $\Delta G^\circ$  con AQDS es de -46.3 KJ/mol  $\text{CH}_4$ , el cual es un valor más negativo que con  $\text{SO}_4^{2-}$ , lo que indica que la oxidación anaerobia de metano con AQDS es termodinámicamente más favorable que con  $\text{SO}_4^{2-}$ . Este hecho apoya entonces nuestra hipótesis de que es factible el proceso de oxidación anaerobia del metano acoplado a la reducción de sustancias húmicas.

Sin embargo, son necesarios otros experimentos para complementar este trabajo, tales como la utilización de  $\text{CH}_4$  marcado, para rastrear el  $\text{CO}_2$  generado de la oxidación, e intermediarios como el acetato y tener una evidencia más clara de este proceso biológico estudiado.

## 8.2. OXIDACIÓN ANAEROBIA DE BENCENO

Existen estudios donde se ha documentado la oxidación anaerobia de benceno utilizando aceptores de electrones como  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , Mn(IV) y Fe(III) (Lovley *et al.*, 1995b, coates *et al.*, 2001, Anderson *et al.*, 1998, Villatoro-Monzón *et al.*, 2008, Kazumi *et al.*, 1997), mientras que con sustancias húmicas existen muy pocos estudios en los que se muestra su efecto en la biodegradación de este hidrocarburo. Lovley *et al.* (1996) encontraron que las sustancias húmicas estimulaban la degradación de benceno, al ser utilizadas como agentes quelantes para mejorar la disponibilidad de óxidos de Fe(III) que fueron utilizados como aceptores de electrones del proceso. Las sustancias húmicas presentaron incluso mejor capacidad para quelar los óxidos de Fe(III) que algunos agentes quelantes sintéticos, estimulando la degradación de 10  $\mu\text{M}$  en 62 días (Lovley *et al.*, 1996a). Sin embargo, el papel de las sustancias húmicas como aceptores de electrones no fue documentado en el estudio. En el 2009, Wei y Finneran observaron que después de varios ciclos de biodegradación de metil-terbutil-eter, con AQDS como aceptor de electrones, por un consorcio anaerobio, los microorganismos fueron capaces de oxidar benceno (2 mM); sin embargo, en esta investigación tampoco se documentó la reducción de AQDS.

En los experimentos de biodegradación de benceno con los inóculos Poza Rica y Ébano, se tuvieron periodos donde el contaminante se adsorbió sobre el inóculo, durante 4 meses y 6 meses, respectivamente. Lovley *et al.* (1996) observaron un comportamiento similar, con una disminución de la concentración de benceno del 60% en el control estéril, probablemente debido a la adsorción en el sedimento en estudios con Fe(III) como aceptor de electrones (Lovley *et al.*, 1996b), y Kazumi *et al.* (1997) utilizando la vía metanogénica para degradar benceno, obtuvieron el 73% de producción de metano de lo esperado según la reacción estequiométrica, esto lo atribuyen a que el benceno pudo haber sido adsorbido por el sedimento o los microorganismos (Kazumi *et al.*, 1997).

La degradación de benceno comenzó luego de 190 días para el inóculo Ébano, posterior a un primer ciclo, y después de 128 días para el inóculo Poza

Rica durante el ciclo inicial, siendo éste en el que el consumo de benceno se observó en un menor tiempo, por lo que se puede pensar que los microorganismos estaban en mayor contacto con hidrocarburos como el benceno u otros hidrocarburos aromáticos, y por lo tanto más adaptados a los mismos.

Los microorganismos capaces de oxidar benceno requieren de largos tiempos de duplicación, tal como se observa en el trabajo realizado por Villatoro-Monzón *et al.* (2008) en el cual la biodegradación del 85% del benceno agregado (4.5  $\mu$ moles) ocurrió en un periodo de 710 días con Fe(III) como aceptor de electrones.

En el presente trabajo se cuantificó un consumo de benceno de 12.8  $\mu$ M para el sedimento Ébano, mientras que la concentración de AH<sub>2</sub>QDS fue de 0.3 mM y la estequiometría obtenida fue de 1:23, cuando el valor teórico es de 1:15. De la misma manera, la estequiometría documentada para el sedimento Poza Rica fue de 1:56, ya que se cuantificó un consumo de benceno de 6  $\mu$ M al final del experimento y 0.34 mM de hidroquinona. Por lo tanto, en ambos casos, se observó una mayor reducción de AQDS que la que se podría esperar de la cantidad de benceno oxidado.

Existen dos factores con los que se podría explicar la alta concentración de AH<sub>2</sub>QDS obtenida en los cultivos durante la biodegradación de benceno. El primero es que el benceno que se adsorbió en ambos consorcios pudiera haberse desorbido estimulando una mayor reducción de AQDS. Para el caso del inóculo Ébano, la cantidad de AH<sub>2</sub>QDS estequiométrica a los 6  $\mu$ M de benceno oxidados corresponde a 0.09 mM, por lo que la cantidad de AH<sub>2</sub>QDS adicional (0.25 mM) pudiera deberse a la oxidación del benceno que previamente fue adsorbido en el sedimento y que pudo haberse desorbido durante la incubación. De hecho, si se considera la cantidad de AH<sub>2</sub>QDS determinada se esperaría que el ~50% (22.7  $\mu$ M) del benceno inicialmente adicionado hubiera sido oxidado. Para el caso del inóculo Poza Rica, para oxidar una concentración de 12.8  $\mu$ M de benceno, la cual fue la reportada al final del experimento, la cantidad estequiométrica de AQDS reducida es de 0.192 mM, por lo que la cantidad remanente (0.108 mM) pudo oxidar 7.2  $\mu$ M del benceno adsorbido en el inóculo, lo cual corresponde a 20  $\mu$ M

(40% de la cantidad originalmente adicionada). El segundo factor, pero menos probable, que pudiera explicar la discrepancia en la estequiometría del proceso estudiado es que el benceno actúa como disolvente de una amplia gama de hidrocarburos, tanto aromáticos como alifáticos y, considerando que ambos consorcios estuvieron expuestos a derrames o brotes de petróleo, es esperado que contengan una cantidad importante de este tipo de contaminantes, los cuales al ser más disponibles para los microorganismos, por la disolución que pudiera estimular el benceno, pudieron haberse degradado de manera paralela al benceno durante la reducción de AQDS.

El proceso de oxidación anaerobia de benceno acoplado a la reducción de sustancias húmicas, tiene implicaciones ambientales importantes, ya que sería una alternativa viable para la biorremediación de cuerpos de agua contaminados con benceno, debido a que el humus se encuentra ampliamente distribuido en ambientes naturales, y de igual forma, podrían diseñarse biorreactores con sustancias húmicas como aceptores finales de electrones debido a su bajo costo, fácil re-oxidación y nula toxicidad (Stevenson, 1994; Lovley *et al.*, 1996). Sin embargo, aun se requiere profundizar en el tema y contestar algunas interrogantes que ha dejado el presente estudio, como por ejemplo: ¿Cuáles son los microorganismos capaces de oxidar benceno con sustancias húmicas en los consorcios estudiados?, ¿Cuáles son las condiciones más apropiadas para que el proceso sea aplicado en condiciones naturales? Además, se requiere de más investigación donde se documente la reducción de quinonas modelo y sustancias húmicas, y se obtenga una estequiometría similar a la teórica.

## IX. CONCLUSIONES

- El presente estudio muestra los primeros indicios de que la oxidación anaerobia de metano puede ser llevada a cabo por microorganismos reductores de humus en el inóculo Ébano; sin embargo, no fue posible documentar el proceso estequiométricamente debido a la gran cantidad de sustratos endógenos presentes en el consorcio.
- El mismo consorcio Ébano mostró capacidad para oxidar anaeróbicamente el metano con  $\text{SO}_4^{2-}$  como aceptor final de electrones, pero no se pudo documentar la reducción del mismo, mientras que no se observó biodegradación de metano con  $\text{NO}_3^-$  y óxidos de Fe(III) y Mn(IV).
- El presente trabajo también proporciona las primeras evidencias cuantitativas y directas de que la oxidación anaerobia de benceno puede ser llevada a cabo por microorganismos reductores de humus en consorcios anaerobios.

## X. FUTUROS EXPERIMENTOS

La oxidación anaerobia de hidrocarburos con sustancias húmicas como aceptores finales de electrones es un tema reciente, del que no se tiene mucha información, por lo que su estudio es de suma importancia para el entendimiento de este proceso, y su posterior aplicación en la biorremediación de cuerpos de agua contaminados con derivados del petróleo, En este trabajo, se mostraron indicios de que ocurre la biodegradación de metano y benceno con sustancias húmicas, pero aún falta mucho trabajo por realizar.

En el caso del metano las actividades a realizar en futuros estudios son las siguientes:

- Mayor número de ciclos de biodegradación de metano con el inóculo Ébano para eliminar el sustrato endógeno, documentar la reducción de la AQDS y la estequiometría de la reacción.
- Monitoreo de los posibles intermediarios en la oxidación anaerobia de metano, como acetato, así como también análisis de los inóculos para determinar posibles aceptores de electrones, esto con la finalidad de completar el ciclo del carbono, así como para determinar qué otros aceptores de electrones se encuentran en los inóculos.
- Ciclos de degradación de metano con el sedimento adaptado, utilizando ácidos húmicos como aceptores finales de electrones, simulando las condiciones propias de los cuerpos de agua naturales, ya que la AQDS al ser una quinona modelo no se encuentra en condiciones naturales.
- Transferencias del inóculo adaptado a nuevas botellas con diferentes concentraciones de metano.
- Pruebas de biodegradación con metano marcado ( $^{13}\text{CH}_4$ ) para rastrear la producción de  $^{13}\text{CO}_2$  y tener una evidencia más certera de la oxidación anaerobia de metano, para rastrear al  $\text{CH}_4$  y asegurar que el  $\text{CO}_2$  generado es debido a la OAM y no al sustrato endógeno.

- Caracterización filogenética del inóculo e identificación de los microorganismos responsables de la oxidación anaerobia de metano. Pruebas con nuevos sedimentos de sitios naturales, como pantanos, debido a la alta producción de metano que se genera en los mismos y a que es posible encontrar microorganismos capaces de realizar la OAM.
- Ciclos de degradación con sulfato como aceptor de electrones para documentar la reducción del mismo.

Mientras que para el benceno, se recomiendan los siguientes experimentos complementarios:

- Ciclos de biodegradación de benceno con ácidos húmicos como aceptores finales de electrones para documentar la reducción del AFE.
- Caracterización filogenética de los inóculos Poza Rica y Ébano e identificación de los microorganismos encargados de oxidar el benceno a CO<sub>2</sub>.
- Pruebas de biodegradación con benceno marcado (<sup>13</sup>C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>) para documentar el grado de mineralización del benceno durante el proceso de biodegradación.

## XI. REFERENCIAS

- **Anderson, R.T. y Lovley, D.R.** 1999. Naphthalene and benzene degradation under Fe(III)-Reducing Conditions in Petroleum-Contaminated Aquifers. *Biorremediation J.* **3**:121-135.
- **Anderson, R.T., Rooney-Varga, J.N., Gaw, C.V. y Lovley, D.R.** 1998. Anaerobic benzene oxidation in the Fe(III) reduction zone of petroleum-contaminated aquifers. *Environ. Sci. Technol.* **32**:1222-1229.
- **Aranda-Tamara, C., Estrada-Alvarado, M.I., Texier, A-C., Cuervo, F., Gómez, J. y Cervantes, F.J.** 2007. Effects of different quinoid redox mediator on the removal of sulphide and nitrate via denitrification. *Chemosphere.* **69**:1722-1727.
- **Atkinson, R.J., Posner, A.M. y Quirk, J.P.** 1967. Adsorption of potential-determining ions at the ferric oxide-aqueous electrolyte interface. *J. Phys. Chem.* **71**:550-580.
- **Beal, E.J., House, C.H. y Orphan, V.J.** 2009. Manganese- and Iron-Dependent Marine Methane Oxidation. *Science.* **325**:184-187.
- **Beck, L.L., Piccot, S.D. y Kirchgensner, D.A.** 1993. Industrial sources. En: Khalili, M. (Ed.) *Atmospheric Methane: Sources, Sinks and Role in Global Change.* Springer-Verlag, New York, N.Y. pp. 341-399.
- **Becker, J.G., Berardesco, G., Rittman, B.E. y Stahl, D.A.** 2005. Effects of Endogenous Substrates on Adaptation of Anaerobic Microbial Communities to 3-Chlorobenzoate. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:449-456.
- **Bedessem, M.E., Swoboda-Colberg, N.G. y Colberg, P.J.S.** 1997. Naphthalene mineralization coupled to sulfate reduction in aquifer-derived enrichments. *FEMS Microbiology Letters.* **152**:213-218.
- **Bell, P.E., Mills, A.L. y Herman, J.S.** 1987. Biogeochemical conditions favoring magnetite formation during anaerobic iron reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2610-2616.

- **Benz, M., Schink, B. y Brune, A.** 1998. Humic acids reduction by propionibacterium freudenreichii and other fermenting bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **4**:115-124.
- **Bradley, P.M., Chapelle, F.M. y Lovley, D.R.** 1998. Humic acids as electron acceptors for anaerobic microbial oxidation of vinyl chloride and dichloroethene. Appl. Environ. Microbiol. **64**:3102-3105.
- **Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C.J. Rickert, D., Widdel, F. y Gieseke, A.** 2000. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. Nature. **407**:623-626.
- **Burland, S.M. y Edwards, E.A.** 1999. Anaerobic benzene degradation linked to nitrate reduction. Appl. Environ. Microbiol. **65**:529-533.
- **Cervantes F.J., Gutiérrez, C.H., López, K.Y., Estrada-Alvarado, M.I., Meza-Escalante, E.R., Texier, A-C., Cuervo, F. y Gómez, J.** 2008. Contribution of quinone-reducing microorganisms to the anaerobic biodegradation of organic compounds under different redox conditions. Biodegradation. **19**:235-246.
- **Cervantes, F.J., Vu-Thi-Thuy, L., Lettinga, G. and Field, J.A.** 2004. Quinone-respiration improves dechlorination of carbon tetrachloride by anaerobic sludge. Appl. Microbiol. Biotechnol. **64**:702-711.
- **Cervantes-Carrillo, F.J.** 2002. Quinones as Electron Acceptors and Redox Mediators for the Anaerobic biotransformation of Priority Pollutants. Tesis de Doctorado. Universidad de Wageningen. Wageningen, Holanda.
- **Cervantes, F.J., de Bok, F.A.M., Tuan, D.D. Stams, A.J.M., Lettinga, G. y Field, J.A.** 2002. Reduction of humic substances by halo-respiring sulphate-reducing and methanogenic microorganisms. Environ. Microbiol. **4**:51-57.
- **Cervantes, F.J., Dijksma, W., Duong-Dac, T., Ivanona, A., Lettinga, G. y Field, J.A.** 2001a. Anaerobic mineralization of toluene by enriched sediments with quinones and humus as terminal electron acceptors. Appl. Environ. Microbiol. **67**:4471-4478.

- **Cervantes, F.J., van der Zee, F.P., Lettinga, G. y Field, J.A.** 2001b. Enhanced decolourisation of Acid Orange 7 in a continuous UASB reactor with quinones as redox mediators. *Water Sci. Technol.* **44**:123-128.
- **Cervantes, F.J., van der Velde, S., Lettinga, G. y Field, J.A.** 2000a. Quinones as terminal electron acceptors for anaerobic microbial oxidation of phenolic compounds. *Biodegradation.* **11**:313-321.
- **Cervantes, F.J., van der Velde, S., Lettinga, G. y Field, J.A.** 2000b. Competition between methanogenesis and quinone respiration for ecologically important substrates in anaerobic consortia. *FEMS Microbiol. Ecol.* **34**:161-171.
- **Coates, J.D., Chakraborty, R. y McInerney, M.J.** 2002. Anaerobic benzene biodegradation-a new area. *Res. Microbiol.* **153**:621-628.
- **Coates, J.D., Ellis, D.J., Blunt-Harris, E.L., Gaw, C.V., Roden, E.E. y Lovley, D.R.** 1998. Recovery of humic-reducing bacteria from a diversity of environments, *Appl. and Environ. Microbiol.* **64**:1504-1509.
- **Coates, J.D., Chakraborty, F., Lack, J.G., O'Connor S.M., Cole, K.A. Bender, K.S. y Achenbach, L.A.** 2001. Anaerobic benzene oxidation coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of *Dechloromonas*. *Nature.* **411**:1039-1043.
- **Comisión Nacional del Agua.** 2005. Estadísticas del Agua en México. [www.cna.gob.mx/eCNA/Espaniol/Organismos/Central/Estadisticas/EstadisticasAgua\\_CNA.htm](http://www.cna.gob.mx/eCNA/Espaniol/Organismos/Central/Estadisticas/EstadisticasAgua_CNA.htm)
- **Critenden, J.C., Trussell, R.R., Hand, D.W., Howe, K.J. y Tchobanoglous, G.** 2005. *Water Treatment: Principles and Design.* Segunda Edición. Ed. Wiley. New Jersey. E.U.A.
- **Curtis, C. y Reinhard M.** 1994. Reductive dehalogenation of hexachloroethane, carbon tetrachloride, and bromoform by anthrahydroquinone disulphonate and humic acid. *Environ. Sci. Technol.* **28**:2393-2401.

- **Dias, C.R. y Portela, M.F.** 1997. Synthesis of phthalic anhydride – catalysis, kinetics, and reaction modeling. *Catalysis Rev. Sci. Eng.* **39**:169-207.
- **Dosemeci, M., Yin S-N. y Linet, M.** 1996. Indirect validation of benzene exposure assessment by association with benzene poisoning. *Environ. Health Perspect.* **104**:1343-1347.
- **dos Santos, A.B., Bisschops, I.A.E., Cervantes, F.J. y van Lier, J.B.** 2004. Effect of different redox mediators during thermophilic azo dye reduction by anaerobic granular sludge and comparative study between mesophilic (30 °C) and thermophilic (50 °C) treatments for decolourisation of textile wastewaters. *Chemosphere.* **55**:1149-1157.
- **Drugokencky, E.J., Houweling, S., Bruhwiler, L., Masaire, K.A., Lang, P.M., Miller, J.B. y Tans, P.P.** 2003. Atmospheric methane levels of: Temporary pause or a new steady-state?. *Geophysical Research Letters.* Doi:10.1029/2003GL018126.
- **Edwards, E.A. y Grbic-Galic, D.** 1992. Complete mineralization of benzene by aquifer microorganisms under strictly anaerobic conditions. *Appl. and Environ. Microbiol.* **58**:2663-2666.
- **Ettwig, K.F., Shima, S., van de Pas-Schoonen, K.T., Kahnt, J., Medema, M.H., op den Camp, H.J.M., Jetten, M.S.M. y Strous, M.** 2008. Denitrifying bacteria anaerobically oxidize methane in the absence of Archaea. *Environ. Microbiol.* **10**:3164-3173.
- **Field, J.A. y Cervantes, F.J.** 2005. Microbial redox reactions mediated by humus and structurally related quinones. En: *Use of Humic Substances to Remediate Polluted Environment: From Theory to Practice.* Perminova, I.V., Hatfield, K. y Hertkorn, N. Holanda. Capítulo 17. 343-352.
- **Finneran, K.T. y Lovley D.R.** 2001. Anaerobic degradation of methyl tert-butyl ether (MTBE) and tert-butyl alcohol (TBA). *Environ. Sci. Technol.* **66**:2006-2011.

- **Fredrickson, J.K., Kostandarithes, H.M., Li, S.W. Plymale A.E. y Daly, M.J.** 2000. Reduction of Fe(III), Cr(VI), U(VI) and Tc(VII) by *Deinococcus radiodurans* R1. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2006-2011.
- **Galushko, A., Minz, D. Schink, B. y Widdel, F.** 1999. Anaerobic degradation of naphthalene by a pure culture of a novel type of marine sulphate-reducing bacterium. *Environ. Microbiol.* **1**:415-420.
- **Hallam, S.F., Girguis, P.R., Preston, C.M., Richardson, P.M. y DeLong, E.F.** 2003. Identification of methyl coenzyme M reductase A (*mrcA*) genes associated with methane-oxidizing archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5483-5491.
- **Hofstettter, T.B., Heijman, C.G., Haderlein, S.B., Holliger, C. Y Schwarzenbach.** 1999. Complete reduction of TNT and other (poly)nitroaromatic compounds under iron-reducing subsurface conditions. *Environ. Sci. Technol.* **33**:1479-1487.
- **Hu, Z., Dou, J., Liu, X., Zheng, X. y Deng, D.** 2007. Anaerobic biodegradation of benzene series compounds by mixed cultures based in optional electronic acceptors. *J. Environ. Sci.* **19**:1049-1054.
- **Intergovernmental Panel on Climate Change.** 1996. En: Houghton, J.T., Meira Filho, L., Callander, B.A., Harris, N., Kattenberg, A., Maskell, K. (Eds.). *Climate Change 1995: the Science of Climate Change.* Cambridge Univ. Press, Cambridge, Uk, 572 pp.
- **Islas-Lima, S., Thalasso, J. y Gómez-Hernández, J.** 2004. Evidence of anoxic oxidation coupled to denitrification. *Water Research.* **38**:13-16.
- **Jahn, M.K., Haderlein, S.B. y Meckenstock, R.U.** 2005. Anaerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene y o-xylene in sediment-free iron reducing enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:3355-3358.
- **Johnson, D., Johnson, K., Ward, G.M. y Branine, M.** 2000. Ruminants and other animals. En: Khalili, M (Ed.), *Atmospheric methane: Its role in global environment.* Springer-Verlag, New York, N.Y., pp. 112.133.

- **Kazumi, J., Caldwell, M.E., Suflita, J.M., Lovley, D.R. y Young, L.Y.** 1997. Anaerobic degradation of benzene in diverse anoxic environments. *Environ. Sci, Technol.* **31**:813-818.
- **Kieft, T.L., Fredrickson, J.K., Onstott, T.C., Gorby, Y.A., Kostandarithes, H.M., Badley, T.L., Kennedy, D.W., Li, S.W. Plymale, A.E., Spadoni, C.M. y Gray, M.S.** 1999. Dissimilatory reduction of Fe(III) and other electron acceptors by a thermus isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1214-1221.
- **Krüger, M., Treude, T., Wolters, H., Nauhaus, K., Boetius, A.** 2005. Microbial methane turnover in different marine habitats. *Paleogeogr. Paleoclimatol. Paleoecol.* **227**:6-17.
- **Lloyd, K.G., Lapham, L. y Teske, A.** 2006. An Anaerobic Methane-Oxidizing Community of ANME-1b Archaea in Hypersaline Gulf of Mexico Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:7218-7230.
- **Lovley, D.R., Fraga, J.L., Coates, J.D. y Blunt-Harris, E.L.** 1999. Humics as an electron donor for anaerobic respiration. *Environ, Microbiol.* **1**:89-98.
- **Lovley, D.R.** 1997. Potential for anaerobic bioremediation of BTEX in petroleum-contaminated aquifers. *Journal of industrial Microbiology.* **18**:75-81.
- **Lovley, D.R., Coates, E.L., Blunt-Harris, E.J.P. y Woodward J.C.** 1996. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature.* **382**:445-448.
- **Lovley, D.R., Woodward, J.C. y Chapelle F.H.** 1995a. Rapid anaerobic oxidation with a variety of chelated Fe(II) Forms. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:288-291.
- **Lovley, D.R., Coates, E.L., Woodward J.C. y Phillips, E.J.P.** 1995b. Benzene oxidation coupled to sulfate reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:953-958.
- **Luton, P.E., Wayne, J.M., Sharp, R.J. y Riley, P.W.** 2002. The *mrcA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiol.* **148**:3521-3530.

- **Martens, C.S. y Berner, R.A.** 1974. Methane production en the interstitial waters of sulphate-depleted marine sediments. *Science*. **185**:1167-1169.
- **Mayr, S., Latkoczy, C., Krüger, M., Günther, D., Shima, S., Thauer, R.K., Widdel, F. y Jaun, B.** 2008. Structure of an F430 variant from Archaea associated with anaerobic oxidation of methane. *J. Am. Chem. Soc.* **130**:10758-10767.
- **Meador, J.P., Casillas, E., Sloan, C.A. y Varanasi, U.** 1995. Comparative bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons from sediment by two infaunal invertebrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **123**:107-124.
- **Meckenstock, R.U., Annweiler, E., Michaelis, W. Richnow, H.H. y Schink, B.** 2000. Anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2743-2747.
- **Modin, O., Fukushi, H. y Yamamoto, K.** 2007. Denitrification with methane as external carbon source. *Water Research*. **41**:2736-2738,
- **Niemman, H., Lösekann, T., de Beer, d., Elvert, M., Nadalig, T. y Knittel, K.** 2006. Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink. *Nature*. **443**:854-858.
- **Petit, J., Jouzel, J., Raynaud, D., Barkov, N., Barnola, J-M., Basile, I., Bender, M., Chappellaz, J., Davis, M., Delaygue, G., Delmotte, M., Kotlyakov, V., Legrand, M., Lipenkov, V., Lorius, C., Pepin, L., Ritz, C., Saltzman, E. y Stievenard, M.** 1999. Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature*. **399**:429-436.
- **Raghoebarsing, A.A., Pol, A., van de Pas-Schoonen, K.T., Smolders, A.J.P., Ettwig, K.F., Rijpstra, I.C., Schouten, S., Sinninghe, J.S., Op den Camp, H.J.M., Jetten, M.S.M. y Strous, M.** 2006. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature*. **440**:918-921.
- **Rau, J., Knackmuss, H.J. y Stolz, A.** 2002. Effects of different Quinoid Redox Mediators on the Anaerobic Reduction of Azo Dyes by Bacteria. *Environ. Sci. Technol.* **36**:1497-1504.

- **Reeburgh, W.S.** 2007. Oceanic methane biochemistry. *Chem. Rev.* **107**:486-513.
- **Reeburgh, W.S.** 1976. Methane consumption in Cariaco Trench waters and sediments. *Earth Planet Sc Lett.* **28**:337-344.
- **Rittman, B.E. y McCarty, P.L.** 2001. *Environmental Biotechnology: Principles and Applications.* Primera Ed. McGraw Hill. New York. USA.
- **Rockne, K.J., Chee-Sandford, J.C., Sandford, R.A., Hedlund, B.P., Staley, J.T. y Strand, S.E.** 2000. Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1595-1601.
- **Stone, A. y Morgan, J.** 1984. Reduction and dissolution of manganese (III) and manganese (IV) oxides by organics: 1. Reaction with hydroquinone. *Environ. Sci. Technol.* **18**:450-454.
- **Rockne, K.J. y Strand, S.E.** 2001. Anaerobic biodegradation of naphthalene, phenanthrene, and biphenyl by a denitrifying enrichment culture. *Water Research.* **35**:291-299.
- **Snyder, R.** 2000. Overview of the toxicology of benzene. *J. Toxicol. Environ. Health.* **61**:339-346.
- **Springer, E., Sachs, M.S., Woese, C.R. y Boone, D.R.** 1995. Partial gene sequences for the A subunit of methyl-coenzyme M reductase (*mrcA*) as a phylogenetic tool for the family Methanosarcinaceae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:554-559.
- **Stevenson, F.J.** 1994. *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions.* Segunda Edición. Ed. Wiley. New York. E.U.A..
- **Stookey, L.L.** 1970. Ferrozine – a new spectrophotometric reagent for iron. *Anal. Chem.* **42**:779-781.
- **Tauer, R.K. y Shima, S.** 2008. Methane as fuel for anaerobic microorganisms. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1125**:150-170.
- **Tauer, R.K. y Shima, S.** 2006. Methane and microbes. *Nature.* **440**:878-879.

- **Treude, T., Orphan, V., Knittel, K., Gieseke, A., House, C.H. y Boetius, A.** 2007. Consumption of methane and CO<sub>2</sub> by methanotrophic microbial mats from gas seeps of the anoxic black sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:2271-2283.
- **U. S. Environmental Protection Agency.** 2007. <http://www.epa.gov/methane/index.html>.
- **U. S. Environmental Protection Agency.** 2006. <http://www.epa.gov/methane/sources.html>.
- **U. S. Environmental Protection Agency.** 2003. Benzene; CASRN 71-43-2. <http://www.epa.gov/NCEA/iris/subst/0276.htm>.
- **Wei, N. y Finneran K.T.** 2009. Microbial community analyses of three distinct, liquid cultures that degrade methyl tert-butyl ether using anaerobic metabolism. *Biodegradation.* **20**:695-707
- **Wegener, G., Niemann, H., Elvert, M., Hinrichs, K-U. y Boetius, A.** 2008. Assimilation of methane and inorganic carbon by microbial communities mediating the anaerobic oxidation of methane. *Environ. Microbiol.* **10**:2287-2298.
- **Widdel, F., Boetius, A. y Rabus, A.** 2006. Anaerobic biodegradation of hydrocarbons including methane. *Prokaryotes.* **2**:1028-10049.
- **Van der Zee, F.P., Lettinga, G. y Field, J.A.** 2000a. Azo dye decolourisation by anaerobic granular sludge. *Chemosphere.* **44**:1169-1176.
- **Van der Zee, F.P., Lettinga, G. y Field, J.A.** 2000b. The role of (auto)catalysis in the mechanism of an anaerobic azo reduction. *Water Sci. Technol.* **42**:301-308.
- **Villatoro-Monzón, W.R., Morales-Ibarra, M.G., Velázquez, E.K., Ramírez-Saad, H. y Razo-Flores, E.** 2008. Benzene Biodegradation under anaerobic Conditions coupled with metal oxides reduction. *Water Air Soil Pollut.* **192**:165:172.

