



UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

Tesis

Efecto de la funcionalización con nitrógeno de la superficie del grafeno
como promotor del crecimiento de bacterias capaces de degradar
hidrocarburos

que presenta:

Alitzel Solís Rodríguez

Para obtener el grado de:

Maestro en ciencias en Ingeniería Química

Asesor de tesis:

D.C. J. Ricardo Rangel Segura

Co-asesor de tesis:

D.C. Verónica Janette Cedeño Garcidueñas



Asunto: Impresión de Tesis.

M.P.P. Venecia Azereet Medina Ortiz,
Jefe del Departamento de Titulación de la
U.M.S.N.H.

Por este medio nos dirigimos a usted de la manera más atenta para notificarle, que después de haberle dado seguimiento al desarrollo de la tesis: "EFECTO DE LA FUNCIONALIZACIÓN CON NITRÓGENO DE LA SUPERFICIE DEL GRAFENO COMO PROMOTOR DEL CRECIMIENTO DE BACTERIAS CAPACES DE DEGRADAR HIDROCARBUROS", después de haber revisado el manuscrito que presentó el alumno Alitzel Solís Rodríguez, con matrícula 2220334F, concluimos que cumple con los requisitos académicos y con lo establecido en el Reglamento General de Estudios de Posgrado para el desarrollo de su Tesis.

Por lo anterior este Comité Tutorial da el aval para su impresión final.

Director de Tesis: Dr. José Ricardo Rangel Segura 86004808

Codirector: Dra. Verónica Janette Cedeño Garcidueñas 12001953

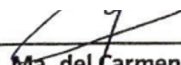
Vocales:

Dra. Mariana Ramos Estrada 04002199

Dr. José María Ponce Ortega 03002829

Dr. José Pascual Bartolo Pérez 10900028

Atentamente.
Morelia, Michoacán a 03 de septiembre de 2024


Dra. Ma. del Carmen Chávez Parga
Coordinador del Programa de Maestría en Ciencias en Ingeniería Química

MCCP./mcpa.

Facultad de Ingeniería Química / Universidad San Nicolás de Hidalgo
Francisco J. Mújica S/N / Col. Fenix del Río / C.P. 58060 / Morelia, Michoacán / Tel y Fax: 443 527 3584
<http://posgrado.fiq.umich.mx/>



RESUMEN

Efecto de la funcionalización con nitrógeno de la superficie del grafeno como promotor del crecimiento de bacterias capaces de degradar hidrocarburos

Por

Alitzel Solís Rodríguez

Julio del 2024

Maestro en Ciencias en Ingeniería Química

Dirigida por: D.C J. Ricardo Rangel Segura

Co-Dirigida por: D.C Verónica Jannette Cedeño Garcidueñas

El objetivo principal de este proyecto es evaluar la factibilidad del uso de óxido de grafeno como promotor del crecimiento de *B. subtilis* en la electrobiorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, específicamente aceite de automotor utilizado. Los derrames de hidrocarburos afectan directamente a la biota, ya que el petróleo contiene compuestos tóxicos que dañan plantas, animales y humanos. Esta estrategia propone el uso de *B. subtilis* como una alternativa para recuperar suelos contaminados, destacando el papel fundamental de la química de superficies en las interacciones entre nanomateriales y microorganismos.

La sección experimental fue abordada en dos etapas: inicialmente se llevó a cabo la síntesis de óxido de grafeno mediante el método modificado de Hummers y la impurificación de dicho material con nitrógeno, empleando varios precursores del mismo; en una segunda etapa se desarrolló el estudio del material biológico mediante pruebas espectrofotométricas y bioquímicas. Los resultados muestran que la hidrazina, como precursor de nitrógeno, favorece el crecimiento bacteriano. La degradación más alta del hidrocarburo dispersado en agua fue de 98.22%, lograda en un medio de cultivo líquido al 100% potenciado por energía eléctrica. En las pruebas realizadas en suelo, la degradación máxima alcanzada fue de 96.51%, observada en la muestra que contenía 10 g de suelo con medio de cultivo al 100%, sin la adición de energía eléctrica.

Palabras clave

Electrorremediación, óxido de grafeno, *Bacillus subtilis*, hidrocarburo, aceite vehicular usado, biorremediación

ABSTRACT

Effect of nitrogen functionalization of graphene surface as a growth promoter of bacteria capable of degrading hydrocarbons

By

Alitzel Solís Rodríguez

July 2024

Master in Sciences in Chemical Engineering

Advisor: D.C. J. Ricardo Rangel Segura.

Co-Advisor: D.C Verónica Jannette Cedeño Garcidueñas

The main objective of the present project is to evaluate the feasibility of using graphene oxide as a growth promoter of *B. subtilis* in the electrobioremediation of soils contaminated with hydrocarbons, specifically used automotive oil. Hydrocarbon spills directly affect biota, since oil contains toxic compounds that harm plants, animals and humans. This strategy proposes the use of *B. subtilis* as an alternative to recover contaminated soils, highlighting the fundamental role of surface chemistry in the interactions between nanomaterials and microorganisms.

The experimental section is divided into two parts: The synthesis of graphene oxide by the modified Hummers method and the impurification of the material with nitrogen precursors; and the study of the biological material, using spectrophotometric and biochemical tests. The results show that hydrazine favors bacterial growth. The highest degradation of hydrocarbon dispersed in water was 98.22%, achieved in a 100% liquid culture medium enhanced by electrical energy. In the tests conducted on soil, the maximum degradation reached was 96.51%, observed in the sample containing 10 g of soil with a 100% culture medium, without adding electrical energy.

Keywords

Electro remediation, graphene oxide, *Bacillus subtilis*, hydrocarbon, used motor vehicle oil, bioremediation.

AGRADECIMIENTOS

En esta sección, deseo agradecer a las personas y a las instituciones que mediante su contribución permitieron que este trabajo de tesis fuese llevado exitosamente a su término.

INSTITUCIÓN

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y a la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ingeniería Química.
por la formación recibida durante mis estudios de maestría en ciencias de la ingeniería química.

Al Instituto Tecnológico del Valle de Morelia y a la facultad de Ingeniería Ambiental.
Por su invaluable apoyo y disposición al facilitar sus instalaciones para la realización de la parte experimental biológica de esta tesis..

ASESORES

Al director de este proyecto de tesis, el Dr. Ricardo Rangel Segura y a la co-directora Dr. Verónica Jannette Cedeño Garcidueñas
por todas sus enseñanzas, su paciencia, tiempo e interés mostrado durante todo este proceso, y por poner a mi disposición los medios y recursos necesarios.

SINODALES

Al comité de sinodales de la presente tesis por las aportaciones hechas para fortalecer este trabajo de investigación:

Dr. José María Ponce Ortega,
Dra. Mariana Ramos Estrada,
Dr. José Pascual Bartolo Pérez

APOYO TECNICO

Los análisis fueron realizados en el Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales del Departamento de Física Aplicada, Cinvestav-IPN-Unidad Mérida; financiado por los proyectos FOMIX-Yucatán 2008-108160, CONACYT LAB-2009-01-123913, 292692, 294643, 188345 y 204822. Se agradece a la Dra. Patricia Quintana por el acceso a LANNBIO, al M.C. Daniel Aguilar Treviño por la obtención de los difractogramas y al M.C. Mario Herrera Salvador por mantenimiento correctivo del difractor D-8 Advance.

Gracias al Dr. Víctor Rejón por su apoyo en la obtención de imágenes mediante Microscopía electrónica de barrido.

A la Dra. Mónica Monserrat Martínez García, por su apoyo para la obtención de los espectros UV-Vis y al Dr. William Santiago González Gómez, agradezco su disposición para la obtención de las mediciones de área superficial.

A la C. María Pérez Arroyo, secretaria del posgrado en Ing. Química, por su apoyo.

A todas las personas que de alguna u otra manera me apoyaron para la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

MIS PADRES

Antonio Solís Lira y María Reyna Rodríguez Aguilar; que me han brindado todos los estudios necesarios para llegar a donde estoy, por apoyarme en cada paso de mi vida, darme la fuerza y paciencia de lograr todo lo que me propongo.

MIS HERMANOS

Ricardo, Iván y Dinorah, que me han inculcado el amor por los estudios, y ciencia; además de demostrarme que con esfuerzo todo se logra.

MIS COMPAÑEROS

Wendolyne, Brian, Gemma, Roberto y Carlos, que hicieron que este camino se sintiera mucho más corto, además de siempre apoyarme explicandome cosas que no entendía y por las noches de desvelo que pasabamos en meet por terminar ejercicios o exámenes.

MI MEJOR AMIGA

La persona que me explicó el proceso para entrar a la maestría y que me animó a tomar esa decisión; a mi compañera durante todo este trayecto, en cosas escolares y personales; mi Vane.

BIANCA

Por acompañarme en mis noches de desvelo mientras elaboraba mis reportes de resultados de experimentación, estudiaba o preparaba este trabajo.

MIS MAESTROS

Quienes depositaron mucha paciencia, y enseñanzas en mí.

Y a todos que creyeron en mí, me alentaron a seguir adelante y no desistir.
Para ellos es este trabajo, pues es a ellos a quienes se las debo por su apoyo incondicional.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 ANTECEDENTES.....	3
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	5
1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
1.4 HIPÓTESIS.....	6
1.5 OBJETIVOS	6
1.5.1 GENERAL.....	6
1.5.2 ESPECÍFICOS.....	6
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1 ACEITE LUBRICANTE VEHICULAR.....	7
2.1.1 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS.....	8
2.1.2 CLASIFICACIÓN DE ACEITES.....	9
2.2 DISPOSICIÓN DE ACEITE VEHICULAR DE REÚSO SEGÚN EL DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN	12
2.3 EFECTOS AMBIENTALES DEL ACEITE VEHICULAR.....	13
2.3.1 CONTAMINACIÓN DE SUELO Y AGUA POR ACEITE AUTOMOTRIZ DE REUSO 15	
2.4 BIORREMEDIACIÓN	15
2.4.1 BIORREMEDIACIÓN <i>IN SITU</i>	18
2.4.2 BIORREMEDIACIÓN <i>EX SITU</i>	19
2.5 ELECTORREMEDIACIÓN DE SUELOS	21
2.6 DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS POR MICROORGANISMOS.....	25
2.7 <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	26
2.7.1 EL GÉNERO <i>BACILLUS</i>	26
2.7.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	27
2.7.3 CICLO DE VIDA	28
2.7.4 DEGRADADORA DE HIDROCARBUROS.....	29
2.8 GRAFENO	30
2.8.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES	30
2.8.2 PROPIEDADES	32

2.8.3	APLICACIONES.....	34
3.	METODOLOGÍA.....	37
3.1	ÓXIDO DE GRAFENO.....	37
3.1.1	SÍNTESIS DE ÓXIDO DE GRAFENO	37
3.1.2	IMPURIFICACIÓN DEL ÓXIDO DE GRAFENO CON NITRÓGENO	38
3.2	AGUA	40
3.2.1	RECOLECCIÓN DE MUESTRA	40
3.2.2	CARACTERIZACIÓN.....	41
3.3	SUELO.....	41
3.3.1	RECOLECCIÓN DE MUESTRA	41
3.3.2	PRETRATAMIENTO A LA MUESTRA	42
3.3.3	CARACTERIZACIÓN.....	42
3.4	MATERIAL BIOLÓGICO	42
3.5	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	43
3.5.1	CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO.....	43
3.5.2	CONTEO EN CÁMARA DE NEUBAUER.....	45
3.6	CELDA ELECTROQUÍMICA	45
3.6.1	PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.....	46
3.6.2	MÉTODO DE INMERSIÓN	46
3.6.3	PROCESO ELECTROQUÍMICO	47
3.7	EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DEL HIDROCARBURO	48
3.7.1	ACEITE DE AUTOMOTOR UTILIZADO	48
3.7.2	PROCESO ELECTROQUÍMICO	49
3.7.3	DETERMINACIÓN DE GRASAS Y ACEITES TOTALES.....	49
3.8	EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DEL HIDROCARBURO EN AGUA .	51
3.8.1	PREPARACIÓN DE MATERIAL	52
3.8.2	PROCESO ELECTROQUÍMICO	52
3.8.3	DETERMINACIÓN DE GRASAS Y ACEITES TOTALES.....	53
3.9	EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DEL HIDROCARBURO EN SUELO	53
3.9.1	PREPARACIÓN DE MATERIAL	53
3.9.2	PROCESO ELECTROQUÍMICO	54
3.9.3	DETERMINACIÓN DE GRASAS Y ACEITES TOTALES.....	54

3.10	EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DEL HIDROCARBURO EN SUELO UTILIZANDO ÓXIDO DE GRAFENO IMPURIFICADO CON HIDRAZINA	55
3.10.1	PREPARACIÓN DE MATERIAL.....	55
3.10.2	PROCESO ELECTROQUÍMICO	56
3.10.3	DETERMINACIÓN DE GRASAS Y ACEITES.....	57
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
4.1	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB).....	59
4.2	ANÁLISIS POR DISPERSIÓN DE ENERGÍA (EDS)	63
4.3	ESPECTROCOPIA FOTOELECTRÓNICA DE RAYOS X (XPS).....	72
4.4	CRECIMIENTO BACTERIANO CON ÓXIDO DE GRAFENO	76
4.4.1	CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO	76
4.4.2	DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE BACTERIAS EN CÁMARA DE NEUBAUER	87
4.5	CRECIMIENTO BACTERIANO CON CELDA ELECTROQUÍMICA	89
4.5.1	CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO	89
4.5.2	CUANTIFICACIÓN EN CÁMARA DE NEUBAUER CON CELDA ELECTROQUÍMICA.....	97
4.5.3	FOTOGRAFÍAS EN CÁMARA DE NEUBAUER.....	98
4.6	BIODEGRADACIÓN DE ACEITE DE AUTOMOTOR USADO EN CELDA ELECTROQUÍMICA.....	100
4.6.1	CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO CON ACEITE EN ELECTROCELDA ELECTROQUÍMICA CON ELECTRODO INMERSO EN MONOETILENGLICOL CON OG NATURAL.....	100
4.6.2	DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE BACTERIAS EN LA CÁMARA DE NEUBAUER EN ACEITE COMO MEDIO DE CULTIVO, EN CELDA ELECTROQUÍMICA CON ELECTRODO INMERSO EN MONOETILENGLICOL Y OG NATURAL	102
4.6.3	FOTOGRAFÍAS EN CÁMARA DE NEUBAUER.....	104
4.6.4	PORCENTAJE DE ACEITE DEGRADADO TRAS MÉTODO SOXHLET	105
4.7	EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DE ACEITE DE AUTOMOTOR USADO EN AGUA.....	105
4.7.1	CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO EN ELECTROCELDA ELECTROQUÍMICA CON ACEITE EN AGUA.....	106
4.7.2	CONTEO EN CÁMARA DE NEUBAUER EN CELDA ELECTROQUÍMICA CON ACEITE EN AGUA	113
4.7.3	PORCENTAJE DE ACEITE DEGRADADO TRAS MÉTODO SOXHLET	114

4.8	EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DEL HIDROCARBURO EN SUELO	116
4.8.1	PORCENTAJE DE ACEITE DEGRADADO TRAS MÉTODO SOXHLET	116
4.9	EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DEL HIDROCARBURO EN SUELO UTILIZANDO ÓXIDO DE GRAFENO IMPURIFICADO CON HIDRAZINA.	118
4.9.1	PORCENTAJE DE ACEITE DEGRADADO TRAS MÉTODO SOXHLET.	118
4.10	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	122
4.10.1	EFFECTO DE LA CORRIENTE ELÉCTRICA Y CANTIDAD DE SUELO	122
4.10.2	CRECIMIENTO BACTERIANO DETERMINADO MEDIANTE ABSORBANCIA Y CONTEO EN CÁMARA DE NEUBAUER	123
4.10.3	COMPARACIÓN GENERAL DE DEGRADACIÓN DE ACEITE.....	124
4.10.4	DISCUSIÓN GENERAL	124
5.	CONCLUSIONES	125
5.1	CONSIDERACIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES	126
6.	BIBLIOGRAFÍA	127

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1 Aceite lubricante vehicular (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, 2014)	7
Figura 2 Tipos de aceite y su composición (Wauquier, 2017).....	9
Figura 3 Línea formada por tambos de aceite vehicular usado sobre el mapa de México (I.N.E.C.C., 2019).....	12
Figura 4 Principales estrategias de biorremediación (Dua & Singh, 2012).....	18
Figura 5 Esquema básico del proceso de electrorremediación, las especies iónicas migran por la acción del campo eléctrico. El frente ácido se forma en el ánodo y migra hacia el cátodo (Alba, 2013).....	22
Figura 6 Funcionamiento de la técnica de movilización de contaminantes mediante campos eléctricos (Murillo, 2016)	23
Figura 7 <i>Bacillus subtilis</i> (Lisboa, 2003).....	28
Figura 8 Estructura del grafeno(Calle, 2017).....	31
Figura 9 Estructura del grafeno y grafito (Urcuyo et al., 2021).....	32
Figura 10 Electrones deslocalizados del grafeno (Castro, 2011)	33
Figura 11 Estructura de bandas electrónicas para metales, semiconductores, aislantes y grafeno (Carmona, 2012).....	34
Figura 12 Aplicaciones del óxido de grafeno en distintas áreas (Huang et al., 2020)	35
Figura 13 <i>Pseudomonas</i> sp sobre acero SAE 1010 con película de grafeno (Viera, 2015)	36
Figura 14 Solución para sintetizar OG en baño de aceite a 40°C	37
Figura 15 OG posterior al secado a 90°C	38
Figura 16 Óxido de grafeno obtenido	38
Figura 17 Horno de Microondas Synthos 300	38
Figura 18 Lavados con agua del OG	39
Figura 19 MEB JEOL JSM 5300 utilizado en la caracterización	39
Figura 20 Espectroscopio de fotoelectrones de rayos X K-Alpha Thermo Scientific utilizado para la caracterización.....	40
Figura 21 Sitio de muestreo de suelo.....	41
Figura 22 Muestra de suelo tamizada y categorizada	42
Figura 23 Medios de cultivo en área estéril	44
Figura 24 Medición de absorbancia en medio de cultivo	44
Figura 25 Alícuotas tomadas de cada medio de cultivo congeladas	44
Figura 26 Medio de cultivo con azul de tripano en CN	45
Figura 27 Muestra en CN bajo montada en microscopio	45
Figura 28 Electrodo de grafito unido a cable de estaño	46
Figura 29 Electrodo escurriendo exceso de solución.....	46
Figura 30 Electrodo secado en estufa.....	47
Figura 31 Fuente de energía Thxbyebye®	48
Figura 32 Celda electroquímica.....	48
Figura 33 Vehículo de donde se recuperó el aceite usado	49
Figura 34 Matraz Kitasato con bomba de vacío para separar la parte sólida de la líquida	50
Figura 35 Equipo Soxhlet montando y operando	51
Figura 36 Equipo de destilación para separar el hexano de la muestra.....	51
Figura 37 Aceite recuperado tras llegar al peso constante.	51
Figura 38 Medios de cultivo en diferentes proporciones con aceite vehicular usado tras ser incubados 15 días.....	52

Figura 39 Aceite recuperado en cada medio de cultivo a diferente proporción tras obtener peso constante	53
Figura 40 Medios de cultivo con muestra de suelo y OG natural tras 15 días de incubación	54
Figura 41 Aceite obtenido tras Soxhlet en M1 y M2	54
Figura 42 Aceite obtenido tras Soxhlet en M3, M4.1 y M4.2.....	54
Figura 43 Medios de cultivo con suelo tras 7 días de incubación.....	56
Figura 44 Medios de cultivo con suelo tras 15 días de incubación.....	57
Figura 45 Aceite obtenido tras arrastre de grasas en M1.15, M2.15 y M3.15	57
Figura 46 Aceite obtenido tras arrastre de grasas en M4.15a y M4.15b.....	57
Figura 47 OG natural visto bajo MEB X30,000	59
Figura 48 OG natural visto bajo MEB X50,000.....	59
Figura 49 OG con urea visto bajo MEX X1,000	59
Figura 50 OG con urea visto bajo MEB X20,000	59
Figura 51 OG con tiourea visto bajo MEB X10,000	60
Figura 52 OG con tiourea visto bajo MEB X50,000	60
Figura 53 OG con etilendiamina visto bajo MEB X10,000	60
Figura 54 OG con etilendiamina visto bajo MEB X30,000	60
Figura 55 OG con hidrazina visto bajo MEB 20,000X	61
Figura 56 OG con hidrazina visto bajo MEB 30,000X.....	61
Figura 57 Suelo+MC-e incubado 7 días en MEB X1,000	61
Figura 58 Suelo+MC-e incubado 7 días en MEB X250	61
Figura 59 Suelo+MC+e incubado 7 días en MEB X500	62
Figura 60 Suelo+MC+e incubado 7 días en MEB X250	62
Figura 61 Suelo+MC-e incubado 15 días en MEB X1,000	62
Figura 62 Suelo+MC-e incubado 15 días en MEB X250	62
Figura 63 Suelo+MC+e incubado 15 días en MEB X250	63
Figura 64 Suelo+MC+e incubado 15 días en MEB X1,000.....	63
Figura 65 Análisis EDS de OG natural.....	64
Figura 66 Análisis EDS de OG impurificado con urea.....	65
Figura 67 Análisis EDS de OG impurificado con tiourea.....	66
Figura 68 EDS de OG con etilendiamina	67
Figura 69 EDS de OG con hidrazina	68
Figura 70 EDS suelo + MC - e incubado 7 días	69
Figura 71 EDS de suelo + MC + e incubado por 7 días.....	69
Figura 72 EDS de suelo + MC – e incubado por 15 días.....	70
Figura 73 EDS de suelo + MC + e incubado por 15 días.....	71
Figura 74 Espectro general XPS del óxido de grafeno (OG).....	73
Figura 75 Espectro general XPS del sistema OG-hidrazina.	74
Figura 76 Espectro general XPS del sistema OG-urea.	74
Figura 77 Espectro general XPS del sistema OG-tiourea.	75
Figura 78 Espectro general XPS del sistema OG-etilendiamina.....	75
Figura 79 Gráfica de crecimiento bacteriano en medio de cultivo nutritivo (blanco).....	77
Figura 80 Gráfica de crecimiento bacteriano en óxido de grafeno natural	79
Figura 81 Gráfica de crecimiento bacteriano en óxido de grafeno impurificado con urea	80
Figura 82 Gráfica de crecimiento bacteriano en óxido de grafeno impurificado con tiourea	82

Figura 83 Gráfica de crecimiento bacteriano en óxido de grafeno impurificado con etilendiamina.	83
Figura 84 Gráfica de crecimiento bacteriano en óxido de grafeno impurificado con hidrazina	85
Figura 85 Gráfica de crecimiento bacteriano de cada variable promediada	86
Figura 86 Conteo de bacterias en cámara de Neubauer	88
Figura 87 Gráfica de crecimiento bacteriano en medio nutritivo (blanco)	90
Figura 88 Gráfica de crecimiento bacteriano en celda electroquímica con electrodo sin tratamiento (blanco).....	91
Figura 89 Gráfica de crecimiento bacteriano en celda electroquímica con electrodo inmerso en PVA con OG natural	93
Figura 90 Gráfica de crecimiento bacteriano en celda electroquímica con electrodo inmerso en monoetilenglicol con OG natural.....	94
Figura 91 Gráfica de crecimiento bacteriano en celda electroquímica de cada variable promediada	96
Figura 92 Gráfica de conteo en cámara de Neubauer	97
Figura 93 Hora 0	Figura 94 Hora 24
Figura 95 Hora 72	Figura 96 Hora 120
Figura 97 Hora 0	Figura 98 Hora 24
Figura 99 Hora 72	Figura 100 Hora 120
Figura 101 Gráfica de crecimiento bacteriano con aceite en celda electroquímica	101
Figura 102 Gráfica de conteo de UFC en cámara de Neubauer.....	103
Figura 103 Hora 0	Figura 104 Hora 24
Figura 105 Hora 72	Figura 106 Hora 120
Figura 107 Gráfica de crecimiento bacteriano en medio de cultivo nutritivo + bacteria (blanco)..	107
Figura 108 Gráfica de crecimiento bacteriano en medio de cultivo al 100%	108
Figura 109 Gráfica de crecimiento bacteriano en medio de cultivo al 50%	109
Figura 110 Gráfica de crecimiento bacteriano en medio de cultivo al 20%	110
Figura 111 Gráfica de crecimiento bacteriano promediada en diferentes porcentajes de medio de cultivo.....	112
Figura 112 Gráfica de UFC/mL por conteo en cámara de Neubauer.....	113
Figura 113 Gráfica de aceite degradado en distintas cantidades de suelo.....	117
Figura 114 Gráfica de aceite degradado en distintas cantidades de suelos tras 7 días de inoculación	119
Figura 115 Gráfica de aceite degradado en distintas cantidades de suelos tras 7 días de inoculación	121

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Composición media de un aceite lubricante y los aditivos más comunes (Builes, 2007)	8
Tabla 2 Sustancias contaminantes presentes en aceites usados. (Ortiz Medina, 2017).....	14
Tabla 3 Cuadro comparativo entre la técnica In y Ex situ.	21
Tabla 4 Características del vehículo del que se recuperó el aceite usado.	48
Tabla 5 Muestras de celda electroquímica.....	56
Tabla 6 Muestra de suelo + medio de cultivo que fueron caracterizadas.....	58
Tabla 7 Especificaciones del espectro EDS para el OG natural	64
Tabla 8 Especificaciones del espectro EDS para el OG con urea	65
Tabla 9 Especificaciones del espectro EDS para el OG con tiourea	66
Tabla 10 Especificaciones del espectro EDS para el OG con etilendiamina.....	67
Tabla 11 Especificaciones del espectro EDS para el OG con hidrazina.	68
Tabla 12 Especificaciones del espectro EDS para la muestra M1.7	69
Tabla 13 Especificaciones del espectro EDS para la muestra M2.7	70
Tabla 14 Especificaciones del espectro EDS para la muestra M1.15	71
Tabla 15 Porcentaje de peso de cada elemento en M2.15.....	72
Tabla 16 Porcentaje atómico de C, O y S de las muestras de OG-N ⁺	76
Tabla 17 Resultado de absorbancia en medio de cultivo inoculado con B. subtilis (blanco)	77
Tabla 18 Resultados de absorbancia en óxido de grafeno natural	78
Tabla 19 Resultados de absorbancia en óxido de grafeno impurificado con urea	80
Tabla 20 Resultados de absorbancia en óxido de grafeno impurificado con tiourea	81
Tabla 21 Resultados de absorbancia en óxido de grafeno impurificado con etilendiamina.....	83
Tabla 22 Resultados de absorbancia en óxido de grafeno impurificado con hidrazina	84
Tabla 23 Resultados de absorbancia de cada variable promediada.....	86
Tabla 24 Resultados de conteo en cámara de Neubauer	88
Tabla 25 Resultados de absorbancia en medio de cultivo inoculado con B. subtilis (blanco)	90
Tabla 26 Resultados de absorbancia en celda electroquímica con electrodo sin tratamiento	91
Tabla 27 Resultados de absorbancia en celda electroquímica con electrodo inmerso en PVA con OG natural.....	92
Tabla 28 Resultados de absorbancia en celda electroquímica con electrodo inmerso en monoetilenglicol con OG natural.....	94
Tabla 29 Resultados de absorbancia en celda electroquímica de cada variable promediada.....	95
Tabla 30 Resultados de conteo en cámara de Neubauer	97
Tabla 31 Resultados de absorbancia de medio de cultivo con aceite en una celda electroquímica	101
Tabla 32 Resultados de conteo en cámara de Neubauer de medio de cultivo con aceite en celda electroquímica	102
Tabla 33 Datos obtenidos tras la aplicación de método Soxhlet en distintas concentraciones de medio de cultivo	105
Tabla 34 Resultados de densidad óptica en medio de cultivo nutritivo + bacteria (blanco)	106
Tabla 35 Resultados de densidad óptica en medio de cultivo al 100%.....	107
Tabla 36 Resultados de densidad óptica en medio de cultivo al 50%.....	109
Tabla 37 Resultados de densidad óptica al 20%	110
Tabla 38 Resultados de absorbancia promedio en diferentes porcentajes de medio de cultivo	111
Tabla 39 Resultados de conteo en cámara de Neubauer en celda electroquímica con aceite en agua	113

Tabla 40 Datos obtenidos tras la aplicación de método Soxhlet en distintas concentraciones de medio de cultivo	114
Tabla 41 Resultados de porcentaje degradado en distintas concentraciones de medio de cultivo ..	114
Tabla 42 Datos obtenidos tras la aplicación de método Soxhlet en distintas cantidades de suelo ..	116
Tabla 43 Datos obtenidos tras la aplicación de método Soxhlet en distintas cantidades de suelo tras 7 días de inoculación	119
Tabla 44 Datos obtenidos tras la aplicación de método Soxhlet en distintas cantidades de suelo tras 15 días de inoculación	120

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental es un problema grave que afecta a nuestro planeta y tiene consecuencias negativas tanto para la salud humana como para los ecosistemas. Existe una gran falta de interés por parte de los ciudadanos e industrias, las cuales son principales generadoras de desechos contaminantes y peligrosos (Gligo et al., 2014).

El sector automotriz es una de las fuentes contaminantes del medio ambiente, por el uso y mantenimiento del vehículo; siendo los productos residuales los de mayor impacto. Dentro de éstos tenemos a los aceites lubricantes de reuso. Anualmente en México, se generan más de 325 millones de litros de aceite proveniente del motor de gasolina o diésel de automóviles, camiones, lanchas, motocicletas, máquinas de textiles, equipo agrícola y las máquinas de cortar césped (I.N.E.C.C., 2019), que al no tener una disposición final adecuada, resultan altamente peligrosos, siendo causantes de enfermedades respiratorias, dérmicas y gastrointestinales. (Enriquez, 2016)

Estos residuos son considerados tóxicos debido a que modifican las propiedades físicas de los suelos y aguas; ya que ocasionan perturbaciones en los ecosistemas al afectar su estructura y bioprocesos. Este tipo de contingencias ambientales originan efectos directos sobre la biota, debido a que el petróleo contiene compuestos químicos tóxicos que producen daños a plantas, animales y humanos; pero principalmente sobre las poblaciones de microorganismos, los cuales representan parte importante de los ecosistemas y son claves para los procesos biogeoquímicos. (Builes, 2007). La estructura funcional de las comunidades microbianas ha sido ampliamente utilizada como indicador biológico, debido a la sensibilidad a algunos cambios y a su capacidad de proveer información que integre diversos factores ambientales. (Mesa, 2019). Para contrarrestar los efectos mencionados, se han desarrollado diversas tecnologías de remediación que mediante acciones físicas, químicas o biológicas pueden alterar la composición de los contaminantes, extraer y separar el contaminante del medio, o inmovilizarlo para que no continúe afectando otras áreas. (Kokalis, 2016).

Una de las tecnologías empleadas para recuperar espacios contaminados con hidrocarburos es la biorremediación. Ésta utiliza elementos biológicos autóctonos del sitio contaminado, que degradan y/o transforman estos contaminantes a sustancias inocuas. La degradación de

hidrocarburos es realizada principalmente por bacterias y hongos(Mesa, 2019). Existen diversas metodologías para la aplicación de microorganismos para la recuperación de los suelos contaminados con petróleo, algunas con mayor eficiencia o limitaciones que otras. Dentro de estas metodologías se encuentra la bioaumentación y bioestimulación que presentan un alto índice de efectividad.(Mesa, 2019).

Se ha especulado si el grafeno y el óxido de grafeno (OG) afectarían las actividades de las bacterias. Los derivados del grafeno con recubrimientos biocompatibles interactúan con los microorganismos y los mecanismos subyacentes y son temas importantes en el ámbito de la nanobiotecnología, y de los cuáles aún queda mucho por explorar. Dichos derivados del grafeno podrían estimular significativamente el crecimiento bacteriano.

Se conoce que existen áreas agrícolas contaminadas por petróleo, y es necesaria la identificación de microorganismos con la capacidad de degradar este contaminante.

De tal manera, que planteamos mediante el desarrollo de la presente investigación estudiar la posibilidad de que el óxido de grafeno (OG) actúe como promotor del incremento de la bacteria *B. Subtilis*. Así mismo, se pretende impurificar con nitrógeno el OG con el propósito de modificar la actividad reproductora de la bacteria con el propósito de potenciar la actividad de las bacterias en el proceso de degradación de hidrocarburos.

El sistema bacteria/OG sería empleado en el estudio de la biodegradación de aceite lubricante vehicular. De esta manera, se propone esta estrategia para el uso de este microorganismo como una alternativa en la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos. Además, este trabajo destaca el papel fundamental de la química de superficies modulando las interacciones entre nanomateriales y microorganismos.

1.1 ANTECEDENTES

El óxido de grafeno (OG) ha atraído el interés en distintas áreas por su estructura y propiedades únicas, que incluyen procesabilidad acuosa, anfifilicidad y funcionalización, lo hacen prometedor para varias aplicaciones (Adarmanabadi et al., 2021). Exhibe propiedades eléctricas, mecánicas y ópticas excepcionales, que incluyen alta conductividad eléctrica, resistencia mecánica superior y características electrónicas ajustables según el grado de oxidación (Huang et al., 2022.)

Estas propiedades hacen que el OG sea adecuado para diversas aplicaciones, como biosensores, tratamiento del cáncer, conductores transparentes, transistores de efecto de campo y dispositivos ópticos. (Adarmanabadi et al., 2021)

En el 2018, Giulio, M., et. Al. (Giulio et al., 2018a) reportaron que el óxido de grafeno exhibe una gran actividad bacteriana hacia bacterias Gram positivas y Gram negativas. Llevaron a cabo pruebas utilizando biofilm in vitro de OG con patógenos de heridas. Utilizaron aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* PECHA 10, *Pseudomonas aeruginosa* PECHA 4 y *Candida albicans* X3 se incubaron con 50 mg/litro de OG durante 2 y 24 h para evaluar el comportamiento bacteriano. En comparación con los respectivos controles de tiempo, el OG redujo significativamente el crecimiento de *S. aureus* tanto a las 2 como a las 24 h de forma dependiente del tiempo, y mostró un efecto bacteriostático con respecto al OG $t = 0$; Se detectó una desaceleración inmediata (después de 2 h) del crecimiento bacteriano para *P. aeruginosa*, mientras que se registró un efecto tardío (después de 24 h) para *C. albicans*. Logrando así que por las propiedades de actividad microbianas del biofilm de OG contra microorganismos de heridas crónicas lo convierte en un candidato interesante.

En otro estudio Bazán, H., et. Al. (Bazán Baez et al., 2021.) Llevaron a cabo una investigación que tenía como objetivo remediar suelos agrícolas ubicados en la zona de Roma Baja en el distrito de Carabayllo, Lima contaminados con plomo. Decidieron utilizar la técnica de electroremediación. El trabajo experimental constó de 3 etapas (27 unidades experimentales) donde cada etapa compendió 9 unidades experimentales, las cuales fueron sometidas a diferentes tiempos e intensidad de corriente. El resultado en porcentaje de remoción de plomo se presentó en la tercera etapa de tratamiento luego de 30 minutos a 30V, siendo de 55,99% con relación al estándar de calidad ambiental del suelo (70 mg/kg). De esta

manera se verificó que el método propuesto es factible para su aplicación en la solución de suelos contaminados.

Por otra parte, Wróbel, M., et. Al (Wróbel et al., 2023) realizaron una revisión bibliográfica acerca de la bioremediación de metales pesados utilizando bacterias resistentes, particularmente especies de *Bacillus*. Donde destacan la capacidad de *Bacillus* para sobrevivir en ambientes contaminados con metales pesados como Pb (plomo) y Cr (cromo), y su potencial para ser utilizadas en procesos de biorremediación. Mencionan estudios sobre diferentes cepas de *Bacillus* que muestran resistencia a metales y sus aplicaciones para la mejora del crecimiento de plantas, así como la promoción de actividades PGPR (bacterias promotoras del crecimiento de plantas). Además, discuten mecanismos como la bioacumulación y biosorción como estrategias clave para la remediación de suelos contaminados.

Asimismo durante el año 2019 Wand, D., et. Al (Wang et al., 2019) investigaron la eliminación del petróleo de las soluciones acuosas mediante el uso de un cultivo bacteriano. El crecimiento del cultivo de *B. subtilis* se observó mediante un medio de crecimiento suplementado con aceite. En este estudio, se probó la capacidad de degradación del petróleo de *B. subtilis*. La degradación del aceite se controló durante un período de 10 días. Se estudió el porcentaje de biodegradación del petróleo por esta bacteria. Las cepas bacterianas podrían utilizar los hidrocarburos del petróleo como única fuente de carbono y energía. Después de la prueba, se encontró que *B. subtilis* tenía un mayor potencial para degradar el petróleo hasta un 71%. La cepa mostró una reducción significativa de los niveles de aceite al final del experimento. Los resultados revelaron que la biomasa viva de los cultivos fue más eficiente en degradar el aceite.

1.2 JUSTIFICACIÓN

Este trabajo tiene como objetivo principal determinar si el óxido de grafeno es promotor en el crecimiento bacteriano de *Bacillus subtilis*; la cual pretende ser empleada en la electrobiorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. El OG que se utilizará en este proceso será modificado químicamente con la adición de nitrógeno, debido a que el nitrógeno podría incrementar la reproducción de las bacterias en el OG. La cantidad del nitrógeno introducido, así como la naturaleza de su enlace químico con el OG, son parte fundamental para comprender los resultados de degradación por lo cual serán estudiados diferentes compuestos que aporten diferentes proporciones de nitrógeno.

Posteriormente, se analizará la eficacia de los distintos sistemas bacteria *Bacillus subtilis* /OG en pruebas de degradación de aceite vehicular, para posteriormente seleccionar el mejor y llevar a cabo el proceso de electrobiorremediación en aguas y suelos.

Mediante el desarrollo del presente proyecto se pretende que la información obtenida sea útil para futuros estudios relacionados con la bioremediación de suelos, que permitan dilucidar la forma en que el OG promueve el crecimiento bacteriano. La importancia de esta investigación radica, en el impacto ambiental que pudiera tener como una alternativa en el proceso de biorremediación en suelos.

1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El aceite lubricante vehicular contiene una serie de sustancias tóxicas como el plomo, cadmio y compuestos de cloro. Verter esta sustancia usada al suelo provoca la destrucción del humus, generando una película que evita la oxigenación ocasionando pérdida de fauna y flora. En los últimos años se han buscado formas amigables con el ambiente, para degradar dicha sustancia, pero no han sido tan efectivas como se desea.

Por lo que, mediante el desarrollo del presente proyecto, se pretende contribuir al desarrollo de alternativas que permitan de forma sustentable degradar el aceite vehicular ya utilizado. De esta manera, se ofrece una alternativa para evitar que éste sea desechado a vertederos, mantos acuíferos, o drenajes de agua.

1.4 HIPÓTESIS

La funcionalización del óxido de grafeno, con diferentes precursores de nitrógeno, proporcionará el crecimiento de la bacteria *Bacillus subtilis*. La cual será empleada en un proceso de electro-biorremediación, para degradar aceite vehicular de reúso.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 GENERAL

Evaluar la factibilidad de que el óxido de grafeno sea promotor del crecimiento del microorganismo *Bacillus subtilis* el cual será empleado en un proceso de electrobiorremediación de suelos contaminados de hidrocarburos (específicamente con aceite de automotor usado).

1.5.2 ESPECÍFICOS

1. Determinar el precursor de nitrógeno que favorezca el incremento de *Bacillus subtilis*, en el sistema óxido de grafeno-nitrógeno (OG-N).
2. Comprobar si el empleo de energía eléctrica estimula a las bacterias en la degradación del hidrocarburo seleccionado.
3. Determinar el mecanismo de interacción bacteria-óxido de grafeno, mediante la observación espectrofotométrica del crecimiento bacteriano.
4. Comparar el aprovechamiento de las bacterias de la fuente de carbono (hidrocarburo)
5. Llevar a cabo el estudio de la degradación del aceite vehicular mediante un proceso electroquímico en agua contaminada con aceite, y posteriormente en suelo contaminado con aceite.

2. MARCO TEÓRICO

El este capítulo se proporciona la base conceptual y científica que sustenta el estudio del óxido de grafeno (OG) y su funcionalización con nitrógeno como promotor del crecimiento de bacterias capaces de degradar hidrocarburos. En esta sección, se abordan los principales conceptos y teorías relacionadas con la contaminación ambiental por hidrocarburos, las técnicas de biorremediación, y el papel de los nanomateriales en la mejora de estos procesos.

2.1 ACEITE LUBRICANTE VEHICULAR

Los aceites lubricantes (Figura 1) son sustancias líquidas derivadas del petróleo, compuestas en su mayoría por mezclas de diversos tipos de hidrocarburos que se utilizan para reducir la fricción de partes rodantes o deslizantes, proteger contra la corrosión, enfriar los sistemas y limpiar algunas piezas. Éstos son el resultado de una combinación de aceites base, que proveen las características lubricantes primarias y aditivos utilizados para aumentar su rendimiento, eficiencia y vida útil. Los aceites base están compuestos por hidrocarburos entre el 75% y el 85% de la composición total. Pueden ser de tipo mineral cuando se obtienen del petróleo, a partir del proceso de refinación, o sintéticos si proceden de procesos de síntesis química. La mezcla de aceites sintéticos y minerales da lugar a los aceites base semi-sintéticos. (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, 2014)



Figura 1 Aceite lubricante vehicular (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, 2014)

2.1.1 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS

Los aceites de automotor básicamente son una mezcla de hidrocarburos parafínicos, nafténicos y aromáticos obtenidos por destilación de crudos petrolíferos (aceites minerales) o por síntesis a partir de productos petroquímicos. (aceites sintéticos) (Builes, 2007)

La variación en la proporción de los diferentes tipos de hidrocarburos en la mezcla determina las características físicas y químicas de los aceites. Una alta fracción de hidrocarburos parafínicos confieren al aceite una mayor resistencia a la oxidación, mientras que un alto contenido de hidrocarburos aromáticos favorece la estabilidad térmica. Para mejorar las presentaciones del aceite como su longevidad es común añadir aditivos, en cantidades entre un 15% y 25%, en volumen de producto terminado. Los aditivos son de distinta naturaleza y confieren al aceite propiedades específicas (antiespumantes, antioxidantes, etcétera) (Builes, 2007)(Observar Tabla 1)

Tabla 1 Composición media de un aceite lubricante y los aditivos más comunes (Builes, 2007)

HIDROCARBUROS TOTALES (75-85%)		
TIPOS DE SUSTANCIA	HIDROCARBUROS	PORCENTAJE EN PESO
Parafínica	Alcanos	45-76%
Nafténica	Cicloalcanos	13-45%
Aromática	Aromáticos	10-30%
ADITIVOS (15-25%)		
PROPIEDAD	COMPUESTO	
Antioxidantes	Ditiofasfatos, fenoles, aminas	
Detergentes	Sulfanatos, fosfatos, fenolatos (De bario, magnesio, zinc, etc.)	
Anticorrosivos	Ditiofosfatos de zinc y bario, sulfanatos	
Antiespumantes	Siliconas, polímeros sintéticos	
Antisépticos	Alcoholes, fenoles, compuestos clorados	

2.1.2 CLASIFICACIÓN DE ACEITES

Los aceites se aplican cuando la temperatura de trabajo es media o elevada. Además, cuando las etapas de relubricación exigidas son cortas. No contienen materiales sólidos o fibrosos, a diferencia de las grasas. Su rango de consistencia varía desde los líquidos delgados hasta sustancias semigrasas. (Wauquier, 2017)

En la actualidad se aplican 3 tipos de aceites lubricantes en los motores actuales (Figura 2), los cuales son: aceite mineral, aceite sintético (multigrado) y aceite semisintético.

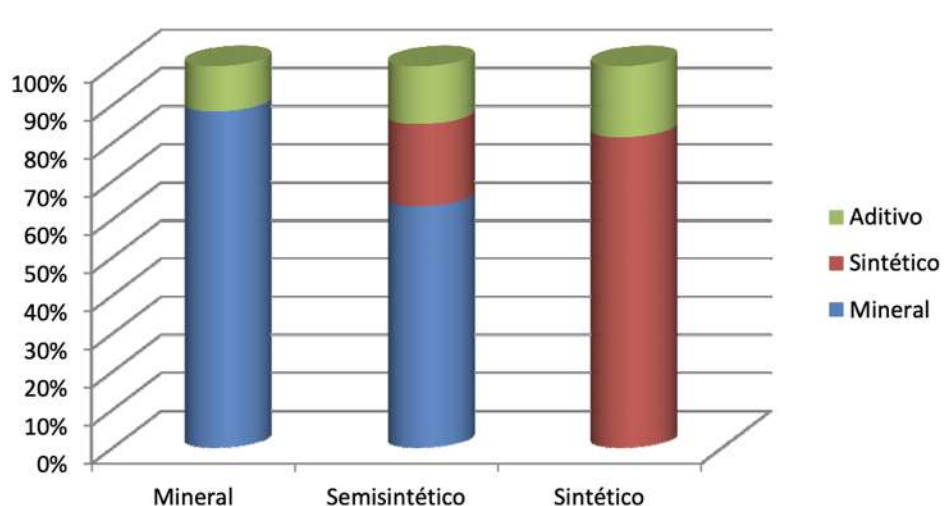


Figura 2 Tipos de aceite y su composición (Wauquier, 2017)

- ACEITE MINERAL

El aceite mineral está compuesto por diversos hidrocarburos de origen mineral que se obtienen mediante un proceso de refinación de petróleo crudo, por lo tanto, su origen es completamente natural. Los aceites base de tipo mineral están constituidos por tres tipos de compuestos parafínicos, nafténicos y aromáticos. Los compuestos parafínicos son los que se encuentran en mayor proporción (60% a 70%), debido a que poseen las mejores propiedades lubricantes; en cambio en menor proporción se encuentran los compuestos naftalénicos y aromáticos que aportan propiedades que no tienen las parafinas como el buen comportamiento a bajas temperaturas y el poder disolvente, entre otros. (Polansky, 2017)

Los lubricantes con base de petróleo tienden a deteriorarse químicamente de manera más progresiva, debido a que no poseen propiedades físicas adecuadas para mantener un

desempeño que asegura la protección del equipo, llegando a presentar fallas prematuras en las unidades, además de pérdidas considerables de eficiencia. (Avallone, 2015)

Esto provoca que el compuesto mineral utilizado como base para lubricantes tenga una estructura química compleja y variada donde, además de los compuestos que están en mayor porcentaje, se encuentran otros compuestos que demeritan la estabilidad química del aceite, provocando mayor susceptibilidad de reaccionar bajo efectos de ciertos elementos catalizadores, como son algunos metales, oxígeno y calor. (Avallone, 2015)

El principal inconveniente que presentan los aceites minerales que se obtienen por destilación fraccionada de petróleo, estando formados por un conjuntos de cadena de diferente longitud. (Hervás, 2021)

- ACEITE SINTÉTICO

Lubricante sintético se puede definir como un producto elaborado a partir de una reacción química entre varios materiales de bajo peso molecular para obtener otro de alto peso molecular con ciertas propiedades específicas superiores a los lubricantes derivados directamente del petróleo. (LUBTEC, 2022)

Los lubricantes sintéticos ameritan su utilización cuando se quieren ampliar las frecuencias entre relubricaciones, reducir el consumo de potencia, disminuir la reposición de partes (repuestos) y alcanzar la máxima capacidad productiva de la maquinaria. (LUBTEC, 2022)

A diferencia de los aceites minerales, los sintéticos no tienen su origen directamente del crudo de petróleo, sino que son creados a partir de subproductos petrolíferos mezclados en procesos de laboratorios, por tal motivo, su manufactura se vuelve más lenta y compleja, y a su vez estos incrementan su valor comercial en el mercado. (Castelló, 2022)

Las propiedades que presentan los aceites sintéticos los hacen apropiados para motores de altas prestaciones sometidos a condiciones de servicio muy severas debido a que se elabora con los compuestos especiales que ofrecen mayores ventajas de protección del motor. La prolongada duración de este aceite permite mayores periodos en el cambio de aceite lo cual compensa su alto costo. (Castelló, 2022)

- ACEITE SEMISINTÉTICO

Los aceites semi-sintéticos, son aceites para motores de combustión interna, los cuales se obtienen del resultado de combinación química de aceite mineral y sintéticos, basándose en una relación de no más de un 30% de aceite sintético y el resto mineral, al crear este tipo de aceites se busca balancear y homogenizar su reestructuración molecular ofreciendo características de las bases sintéticas y dar propiedades mejores que las bases minerales.(Polansky, 2017)

Gracias a esta combinación se logra obtener este lubricante con características específicas, y de estándares de calidad media y comercialmente más accesible.(Polansky, 2017)

La aplicación de un aceite semi-sintético va ligado con los medios y costos que existan para adquirir un aceite, ya que este aceite al ser una mezcla de bases sintéticas y mineral, que cumplen requisitos de calidad, son encontrados en el mercado a un precio moderadamente menor en comparación de otro tipo de aceite.(Hervás, 2021)

Es recomendable el uso de este aceite semi-sintético, para vehículos y/o motores que han tenido ya un alto índice de uso o altos kilometrajes, debido a que sus piezas mecánicas ya han sufrido un notable desgaste, por el largo tiempo de su uso. Su funcionamiento es adecuado para trabajar con partículas o residuos de suciedad; ejemplo: un motor que tiene años de trabajo, entre su estructura interna del motor se adhieren residuos de suciedad, que pasan a ser casi parte de la estructura interna del motor, ahora si a este mismo motor le aplicamos un aceite sintético, este con sus altas propiedades afectaría limpiando agresivamente al motor, dejando una separación entre piezas, trayendo consigo averías en el motor tales como ruidos anormales, pérdida de compresión y potencia, temperaturas anormales, consumo de aceite y presencias de humos en la línea de escape. (Castelló, 2022)

2.2 DISPOSICIÓN DE ACEITE VEHICULAR DE REÚSO SEGÚN EL DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN

En beneficio de la salud y la protección del medio ambiente, en años recientes se han expedido una serie de disposiciones jurídicas que buscan atender la gestión integral de los residuos. (Bustos, 2017)

Anualmente en México, se generan más de 325 millones de litros de aceite proveniente de motores de gasolina o diésel de automóviles, camiones, lanchas, motocicletas, máquinas de textiles, equipo agrícola y las máquinas de recortar césped, de acuerdo con datos reportados por el Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. Si en un supuesto, estos residuos se colocaran en recipientes de 200 L, se podría formar una línea que va desde la CDMX hasta monterrey. (Figura 3) (I.N.E.C.C., 2019)

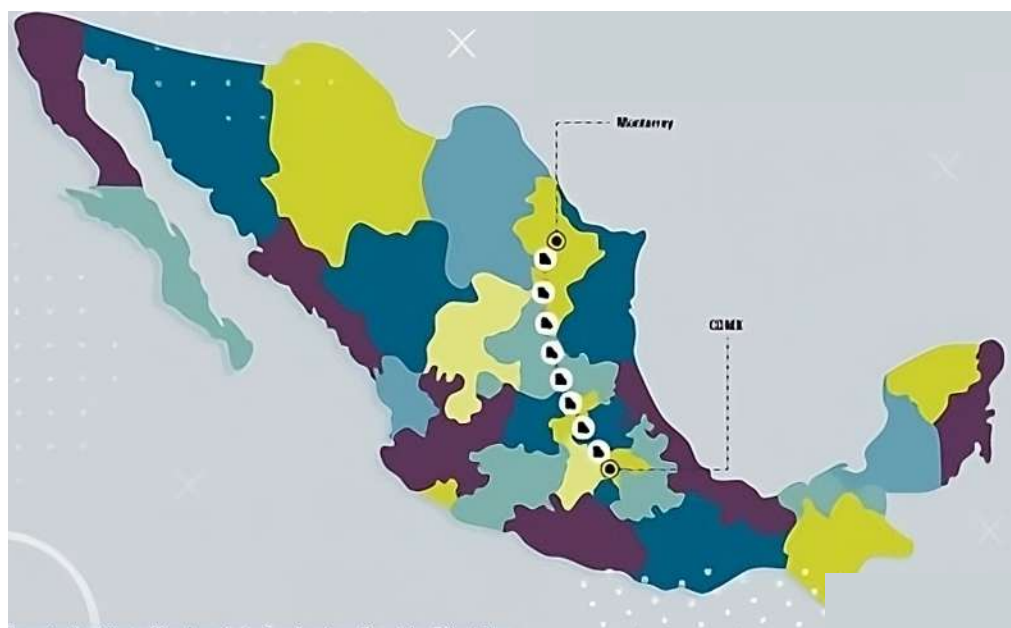


Figura 3 Línea formada por tambores de aceite vehicular usado sobre el mapa de México (I.N.E.C.C., 2019)

El aforo vehicular en México es de alrededor de 20 millones de vehículos, los cuales se someten dos veces al año al cambio de aceite, proceso en el que se utilizan entre dos y cuatro litros de aceite, y por tanto se desecha un tanto igual. Por lo que aproximadamente se generan

entre 40 millones de litros y 80 millones de litros de aceites automotrices usados por esta causa. (Shehu, 2023)

Por sus características físicas y químicas, un litro de aceite usado y mal manejado puede contaminar un millón de litros de agua, dañando así la agricultura, la fauna, la flora, al ser humano y plantas de tratamiento de aguas residuales. Al 2005, la SEMARNAT había detectado 432 sitios abandonados ilegales contaminados con residuos peligrosos, algunos de ellos mezclados con aceites usados automotrices. Concentraciones de 50 a 100 partes por millón (miligramos por litro) de aceite usado contaminan los procesos de tratamiento de aguas residuales y su vertimiento continuo al drenaje afecta la operación de las plantas de tratamiento. La Conagua precisó en 2007 que de los 2.35 millones de metros cúbicos aguas residuales que se generan, sólo se tratan el 2.06 millones de metros cúbicos. (Bustos, 2017) Aunado a lo anterior, la Ley General para la prevención y gestión integral de los residuos en su artículo 106, fracciones I, III, IV, XIV y XV, prevé disposiciones comunes a la gestión integral de residuos, también aplicables a los aceites usados automotrices prohíbe el acopio, almacenamiento, transportación, o disposición final de residuos peligrosos, sin contar con la debida autorización para ello, la mezcla de residuos peligrosos que sean incompatibles entre sí, el vertimiento o disposición final en sitios no autorizados para ello y no registrarse como generador. (M.A.E., 2022)

El manejo integral de estos aceites permite su reciclado, genera energía, protege nuestra salud y evita la contaminación de nuestro aire, suelo y agua. (Bustos, 2017)

De esta manera, en México está prohibido eliminar el aceite de tu auto en cualquier parte, teniendo que acudir a establecimientos autorizados por ley para la recolección de este tipo de residuos. (M.A.E., 2022)

2.3 EFECTOS AMBIENTALES DEL ACEITE VEHICULAR

Los aceites lubricantes usados están compuestos por partículas metálicas ocasionadas por el desgaste de partes del vehículo, agua, compuestos organometálicos contenidos en el plomo de la gasolina, ácidos orgánicos producto de la oxidación o por el azufre presente en los combustibles, compuestos halogenados, metales pesados, residuos de aditivos, compuestos

de zinc, cloruro y fósforo, y algunos contienen bifenilos policlorados (PCBs), considerados como agentes cancerígenos, entre otros. (Ortiz Medina, 2017)

De acuerdo con la legislación internacional los aceites desechados contienen elementos perjudiciales para la salud como el plomo, cromo, bario, aluminio, zinc, halógenos y compuestos halogenados. En la Tabla 2 se muestra un resumen de las sustancias contaminantes presentes en los aceites usados y el origen de estas.

Tabla 2 Sustancias contaminantes presentes en aceites usados. (Ortiz Medina, 2017)

CONTAMINANTE	ORIGEN
Bario	Aditivos detergentes
Calcio	Aditivos detergentes
Plomo	Gasolina plomada – Desgaste de piezas
Magnesio	Aditivos detergentes
Zinc	Aditivos anti-desgaste y antioxidantes
Fósforo	Aditivos anti-desgaste y antioxidantes
Hierro	Desgaste del motor
Cromo	Desgaste del motor
Níquel	Desgaste del motor
Aluminio	Desgaste de rodamientos
Cobre	Desgaste de rodamientos
Estaño	Desgaste de rodamientos
Cloro	Aditivos – Gasolina plomada
Silicio	Aditivos
Azufre	Base lubricante – Productos de combustión
Agua	Combustión

2.3.1 CONTAMINACIÓN DE SUELO Y AGUA POR ACEITE AUTOMOTRIZ DE REUSO

Partiendo de los elementos contenidos en los aceites usados y el hecho evidente de que no son fácilmente biodegradables, una inadecuada disposición y manejo de estos traerá consigo severos impactos negativos al ambiente y a la salud humana. En contacto con el agua estos aceites forman una película con propiedades impermeables que impide la oxigenación provocando la muerte de la vida acuática; al ser vertidos en sistemas de alcantarillado y cuerpos de agua, las bacterias utilizadas para la degradación en los sistemas de tratamiento no van a ser capaces de degradar completamente estos aceites, llevando toda su toxicidad a la población que abastezca. (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, 2014)

Al llegar al suelo, estos aceites comenzarán a infiltrarse generando toxicidad por su contenido de metales, impactando en la capacidad del suelo de retener contaminantes, provocando una degradación de este y quedando como resultado suelos poco fértiles. Así mismo, debido a la continua infiltración, estos aceites llegan a las aguas subterráneas contaminando pozos de captación y acuíferos. Indudablemente y al igual que su efecto en el agua, la filtración de aceites usados en el suelo impacta de manera significativa en la salud de las personas que cultiven para su sustento y se abastezcan de pozos de agua subterránea. En la atmósfera este residuo también representa impactos altamente negativos, al incinerar los aceites se generan emisiones altamente tóxicas por su contenido de PCBs, elevando aún más las probabilidades de contraer enfermedades, en algunos casos mortales por la población que inhale tales emisiones. (Cogollo, 2017)

2.4 BIORREMEDIACIÓN

La Biorremediación existe aproximadamente desde el año 600 A.C.; cuando los antiguos romanos dirigían sus aguas residuales a pozos o tanques fuera de la ciudad donde eran tratadas por la actividad microbiana, por lo que se puede decir que, la Biorremediación no es un concepto nuevo. Los microbiólogos han estudiado el proceso desde la década de 1940, ZoBell en 1946 revisó la acción de microorganismos sobre hidrocarburos. Él reconoció que

muchos microorganismos, tienen la capacidad de utilizar hidrocarburos como única fuente de energía. Identificó, además, que existía una relación altamente dependiente entre la naturaleza química de los compuestos del petróleo y los microorganismos dentro de la mezcla. (N. León & Arias, 2020)

Hasta hace algunos años, se creía que teníamos una abundancia ilimitada de recursos en la tierra; sin embargo, hoy nos damos cuenta de que esto no es verdad pues los recursos en la tierra, en mayor o menor grado, gracias a nuestro descuido y negligencia en su uso, se están agotando. La contaminación ambiental está aumentando día a día debido al incremento de la población, la industrialización y la urbanización. En la actualidad, se sabe que la contaminación afecta a la salud de los seres vivos por lo que resulta necesario desarrollar estrategias para solucionar los problemas de contaminación. (Prenafeta, 2016)

El término biorremediación fue acuñado a principios de la década de los '80, y proviene del concepto de remediación, que hace referencia a la aplicación de estrategias fisicoquímicas para evitar el daño y la contaminación en suelos. Los científicos se dieron cuenta que era posible aplicar estrategias de remediación que fuesen biológicas, basadas esencialmente en la observación de la capacidad de los microorganismos de degradar en forma natural ciertos compuestos contaminantes. Entonces, la biorremediación surge como una rama de la biotecnología que busca resolver los problemas de contaminación mediante el uso de seres vivos (microorganismos y plantas) capaces de degradar compuestos que provocan desequilibrio en el medio ambiente, ya sea suelo, sedimento, fango o mar. (Cota & Núñez, 2018)

Debe ser factible de aplicar en condiciones de campo, respetuosa con el entorno natural en el que tiene que desarrollarse; y competitiva desde el punto de vista económico. Dentro de las dificultades se encuentran que para muchos tipos de vertidos su efectividad no ha sido determinada, es de difícil aplicación en el mar, el tiempo necesario para su actuación es largo, su implementación es específica para cada lugar contaminado y su optimización requiere información sustancial acerca del lugar contaminado y de las características del vertido. (Builes, 2007)

Este proceso en suelos es empleada para atacar o sustraer agentes contaminantes específicos del suelo, se realiza por medio de degradación o transformación de diferentes compuestos nocivos en otros de menor toxicidad o materia orgánica en descomposición. Estas

degradaciones o cambios ocurren usualmente en la naturaleza y una adecuada manipulación de los sistemas biológicos puede aumentar la velocidad de cambio o degradación. (Cota & Núñez, 2018)

La gran diversidad estructural de contaminantes ambientales que son degradados por microorganismos (fundamentalmente bacterias y hongos), los convierte en potencialmente usables para la biorremediación. Contaminantes recalcitrantes como los bifenilos policlorados, componentes de los destilados de la refinación del crudo, los hidrocarburos aromáticos policíclicos, las resinas y los asfáltenos, se mineralizan a dióxido de carbono por varias especies de hongos del tipo ligninolíticos y bacterias, incluyendo mezclas complejas de estas sustancias. (Dúa & Singh, 2012)

La biorremediación puede llevarse a cabo en el lugar contaminado, proceso conocido como biorremediación in situ, o bien en un lugar especialmente preparado, conocido como biorremediación ex situ. En este último la matriz contaminada se transfiere a otro lugar. (Dua & Singh, 2012). En la figura 4 se muestran las distintas estrategias de biorremediación.

En las primeras, los suelos y las aguas contaminadas son tratados en el propio lugar de la contaminación sin transformación. En las segundas, implica la excavación o traslado de los suelos contaminados; y en el caso de las aguas, significa el bombeo-tratamiento-recarga o traslado a reactores.

La selección de la técnica depende de tres principios básicos:

- La bioquímica, que es la posibilidad de que el contaminante sea transformado biológicamente
- La biodisponibilidad, que es la accesibilidad del microorganismo al contaminante.
- La bioactividad, que es la oportunidad de optimizar la actividad biológica. (Builes, 2007; Dua & Singh, 2012)

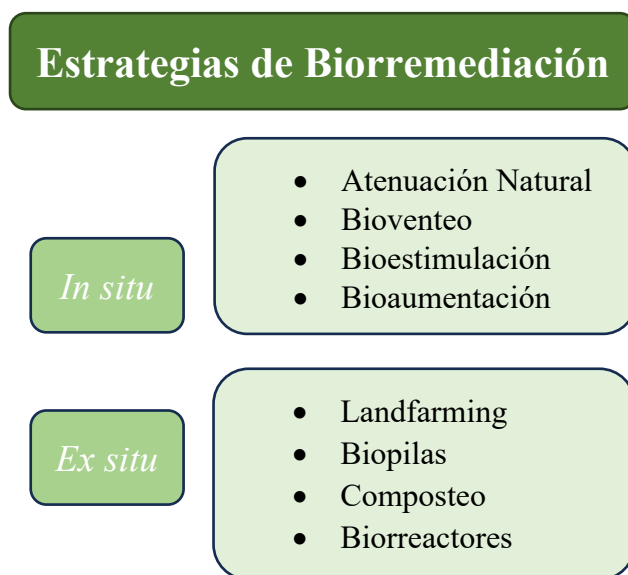


Figura 4 Principales estrategias de biorremediación (Dua & Singh, 2012)

2.4.1 BIORREMEDIACIÓN *IN SITU*

Básicamente existen cuatro métodos de biorremediación in situ:

- Atenuación natural

Proceso intrínseco de biorremediación, depende de diversos factores físicos, químicos y biológicos que, bajo condiciones favorables, actúan sin la intervención del humano para reducir la masa, volumen, toxicidad o concentración de los contaminantes. (Srivastava, 2015)

- Bioventeo

Consiste en suministrar aire e incluso nutrientes al área contaminada mediante la adecuación de una red de ductos y tuberías, se caracteriza por proveer tasas “moderadas” de aire para estimular el metabolismo aerobio de los microorganismos y promover la oxidación de los compuestos contaminantes, al mismo tiempo que se minimiza la volatilización de los contaminantes a la atmósfera. (Vivaldi, 2013)

- Bioestimulación

Estrategia muy similar al bioventeo, se basa en aumentar la actividad de las bacterias endógenas de los suelos contaminados al proveerles nutrientes, oxígeno, surfactantes o agua, o al modificar otras variables ambientales. Sin embargo; tiene sus limitaciones debido a que en ocasiones los suelos no cuentan con los microorganismos adecuados para degradar los contaminantes o la concentración de estos últimos es elevada. (Zawierucha, 2013)

- Bioaumentación

Proceso mediante el cual se añaden microorganismos al ambiente contaminado con el objetivo de acelerar la biorremediación se puede llevar a cabo mediante: (Zawierucha, 2013)

- a) Enriquecimiento o aislamiento de microorganismos del sitio objetivo, su subsecuente cultivo y re-inoculación.
- b) Exclusión de microorganismos.
- c) Introducción de microorganismos genéticamente modificados.

2.4.2 BIORREMEDIACIÓN *EX SITU*

Dentro de los métodos de biorremediación *ex situ* se encuentran las siguientes técnicas de tratamiento de suelos

- Landfarming (Cultivo en la tierra)

Consiste en remover el suelo contaminado y verterlo sobre una cama previamente preparada en cuyo fondo se encuentre una geomembrana (que se utiliza como aislante para evitar filtraciones al subsuelo). En general, las superficies de suelo excavadas oscilan los 10-35 cm. Una vez que el suelo se ha vaciado en la cama, se estimulan los consorcios microbianos para que inicien con la degradación de los contaminantes. (Villegas, 2014)

Proceso de degradación de residuos orgánicos basado en el metabolismo microbiano anaerobio, típicamente se lleva a cabo a temperaturas entre 55 – 65 °C. Las temperaturas elevadas son producto de la actividad biológica. (N. Das, 2014)

- Biopilas

Se basa en mezclar suelos contaminados con suelos previamente preparados, para después colocarlos en un área determinada; la biorremediación se lleva a cabo utilizando aireación. Diversos parámetros como la humedad, nutrientes, calor, oxígeno y pH son controlados. Cabe señalar que la aireación y el propio sistema de control de nutrientes se pueden realizar ya sea por vacío o por presión positiva. En la práctica, el uso de biopilas ha resultado ser una técnica exitosa para remediar sitios contaminados con petróleo. (Bazán Baez et al., 2020)

- Biorreactores

Trata materiales sólidos (suelos, sedimentos, lodos) o aguas contaminadas. En esencia, las matrices contaminadas son transferidas a recipientes con inóculos, nutrientes y parámetros controlados para su biorremediación. (Leabana, 2017). Los biorreactores de sólidos en suspensión (SB, por sus siglas en inglés), son unos de los más usados para biorremediar suelos contaminados debido a su capacidad para controlar las condiciones de operación y para aumentar la actividad microbiana. (Dzionek & Wojcieszynska, 2016)

Los SB son contenedores equipados para crear condiciones de tres fases (sólido, líquido y gas) y para incrementar las tasas de biorremediación de los contaminantes al aumentar la biodisponibilidad de los contaminantes hacia la biomasa. (N. Das, 2014)

Se componen de cuatro partes: una batería para el manejo y acondicionamiento del suelo contaminado, el biorreactor per se, instalaciones para manejo y disposición de suelos tratados y, por último, equipos e instrumentos auxiliares para el monitoreo y manejo de los flujos del proceso. (N. Das, 2014)

Generalmente, las tasas de biodegradación que proveen estos sistemas son mejores a las de los sistemas in situ, debido a que los parámetros son más manejables y por lo tanto controlables y predecibles. (Villegas, 2014). En la Tabla 3 se muestra una comparación entre ambas técnicas.

Tabla 3 Cuadro comparativo entre la técnica *In situ* y *Ex situ*.

	<i>In situ</i>	<i>Ex situ</i>
Ventajas	1.- Se puede tratar el sitio contaminado sin tener que transportar el material, ya que los aditivos se pueden mezclar directamente. 2.- Su costo es menor que en la técnica <i>Ex situ</i> .	1.- El tiempo de tratamiento es más corto. 2.- El resultado del tratamiento es más seguro, ya que permite una mayor facilidad de mezclado. 3.- Permite el uso de distintos microorganismos.
Desventajas	1.- El tiempo de tratamiento se hace más largo. 2.- Corre el riesgo de no ser seguro porque no es posible darle uniformidad al suelo. 3.- Es muy difícil verificar que se encuentre funcionando bien el proceso.	1.- Se necesita excavar en el suelo. 2.- Aumenta su costo, porque requiere transporte y equipos. 3.- Existe mayor riesgo de exposición al contaminante. 4.- Impacto en el medio ambiente por remoción del terreno o agua. 5.- Requiere espacios amplios y controlados.

2.5 ELECTORREMEDIACIÓN DE SUELOS

La remediación electrocinética o electrorremediación (Figura 5) es una tecnología innovadora que puede utilizarse para la remediación *in situ* de suelos contaminados con metales o compuestos orgánicos polares; es una técnica aplicable principalmente a suelos de baja permeabilidad, aprovechando las propiedades conductivas del suelo con el uso de un campo eléctrico que permite remover las especies cargadas (iones) implicando la aplicación de una corriente directa de baja intensidad entre un electrodo positivo y uno negativo (ánodo y cátodo respectivamente) saturando la matriz generalmente con agua o algún otro líquido con una sal que actúe como medio iónico. (Alba, 2013)

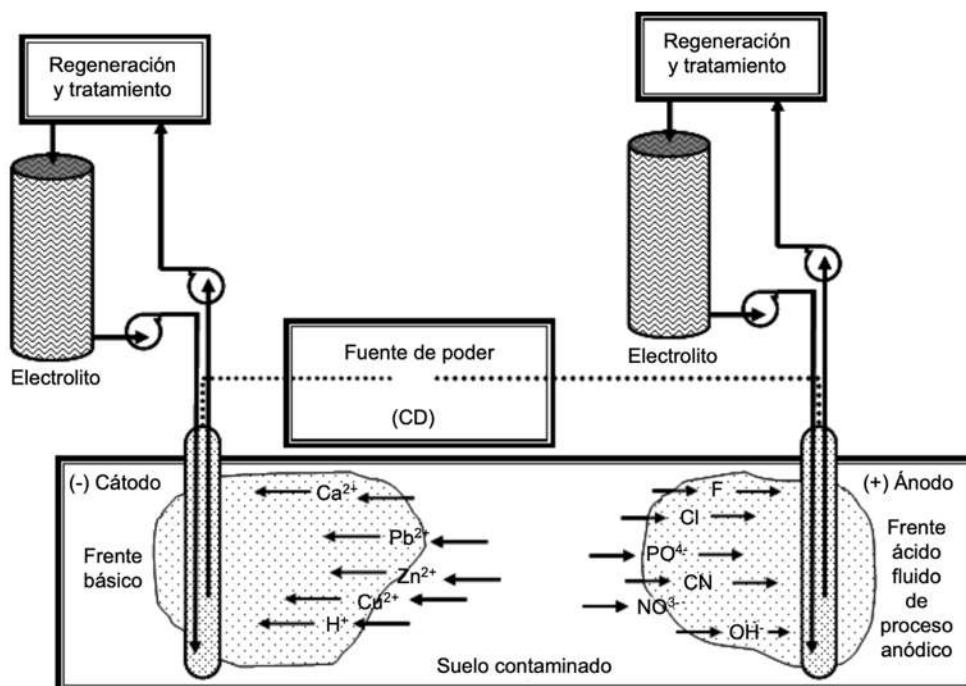


Figura 5 Esquema básico del proceso de electroremediación, las especies iónicas migran por la acción del campo eléctrico. El frente ácido se forma en el ánodo y migra hacia el cátodo (Alba, 2013)

La acción del electrolito permite transportar el contaminante hacia los pozos donde será extraído. Al contrario del arrastre de fluidos, esta técnica permite establecer la migración dirigida, la cual evita la dispersión del contaminante fuera de la zona del tratamiento. Además de que una parte importante es el proceso de electrólisis del agua, produce una disociación que genera iones hidrógeno (H^+) en el ánodo y iones hidroxilo (OH^-) en el cátodo, liberando oxígeno e hidrógeno respectivamente. (Bazán Baez et al., 2020)

Como consecuencia de la aplicación del campo eléctrico, se generan principalmente tres fenómenos electrocinéticos (Figura 6), estos son:

- Electroósmosis

Representa el movimiento del líquido con respecto a las superficies sólidas inducido por el campo eléctrico. Esto se produce debido a que en las superficies no equilibradas de las partículas del suelo predominan las cargas negativas, y atraen al líquido hacia el cátodo, que se comporta como un gran catión. (Murillo, 2016)

- Electromigración

Mecanismo primario de la remediación, también llamado migración iónica, es el movimiento de especies iónicas disueltas, que están presentes en el fluido del poro, debido a la influencia de un campo eléctrico. (Murillo, 2016)

- Electroforesis

Corresponde al desplazamiento de partículas coloidales cargadas en suspensión en un líquido, tiene una importancia muy inferior a la de los dos anteriores en este proceso. (Murillo, 2016)

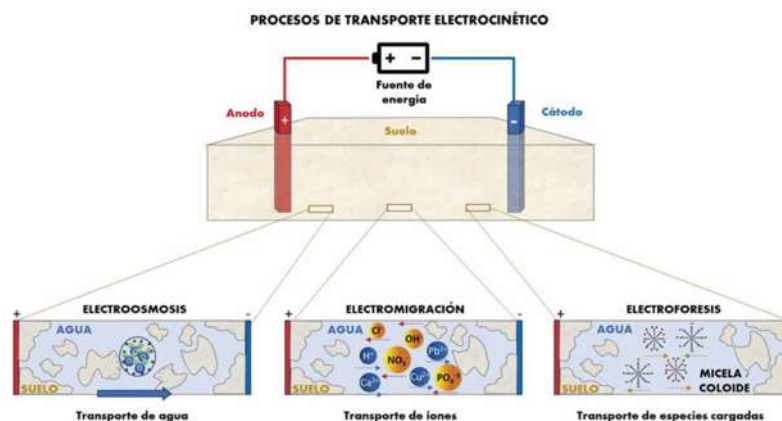


Figura 6 Funcionamiento de la técnica de movilización de contaminantes mediante campos eléctricos (Murillo, 2016)

Las etapas de transformación del contaminante dependen de las especies químicas y de las condiciones del medio ambiente. No obstante, la mayoría de los contaminantes pueden transformarse a algunas de sus especies solubles. En el proceso de electrorremediación el ambiente ácido en el ánodo favorece la desorción y disolución de metal, algunos iones pueden existir como cationes o como complejos aniónicos, sin embargo, el ambiente generado al cátodo puede impedir la solubilización de los contaminantes que contengan iones metálicos. (García-Guirado, 2020)

En algunos casos, es necesario utilizar soluciones para reforzar la solubilización y transporte de contaminantes metálicos. Ácidos como el acético, puede utilizarse en el cátodo para neutralizar los hidroxilos generados por la reducción electrolítica del agua. La ventaja del ácido acético es que permite despolarizar los iones hidroxilo generados por el proceso de

reducción catódica, además muchos acetatos metálicos son altamente solubles. La concentración de iones generados por la disociación del agua es bajo debido a su alto valor de pKa del ácido acético, los iones acetato previenen la formación de otras sales insolubles en la vecindad del cátodo, esto previene el desarrollo de una zona de baja conductividad eléctrica, y la disipación excesiva de energía en el suelo cerca a esta región y la conductividad eléctrica del suelo no se afecta grandemente, también es ambientalmente seguro y biodegradable. (T. & S, 2022)

Se podría asumir que la electrorremediación es una técnica que aparenta ser sencilla, sin embargo, existen varios factores fisicoquímicos que influyen en el transporte de los contaminantes, y por ende en una efectiva remediación del suelo contaminado. Los factores de mayor importancia son:

- c) pH
- d) Contenido de agua
- e) Conductividad eléctrica
- f) Potencial zeta
- g) Naturaleza y química del suelo
- h) Naturaleza del contaminante
- i) Naturaleza del electrodo

La eficiencia de esta tecnología disminuye en medios con contenido de humedad menor al 10% y la presencia de ciertos metales o materiales aislados que provocan variaciones en la conductividad eléctrica del suelo; algunos depósitos minerales (alta conductividad eléctrica) pueden provocar problemas; y valores extremos de pH y reacciones de óxido-reducción pueden disminuir su eficiencia y formar productos indeseables. Los costos de este tratamiento varían en función de la cantidad de suelo a tratar, la conductividad y tipo de contaminante estando alrededor de \$600/m³ (Alba, 2013)

2.6 DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS POR MICROORGANISMOS

La degradación de los hidrocarburos por microorganismos se basa en su capacidad de aceptar como sustrato sustancias orgánicas para transformarlas en compuestos menos tóxicos, o inocuos y/o eliminarlos de forma total produciendo CO₂, agua y biomasa microbiana. El resultado del proceso de biorremediación depende de las características de la población microbiana (biomasa, actividad enzimática, diversidad de la población, tipo de metabolismo), características del sitio (nutrientes, donadores y receptores de electrones, condiciones ambientales inhibidoras, pH, temperatura, etc.) y características del sustrato (estructura química del contaminante, toxicidad, solubilidad y concentración del contaminante). Estos factores determinan si es necesario un periodo de aclimatación del microorganismo y son indicadores del mecanismo de degradación del contaminante y si éste servirá como sustrato primario, secundario o co-metabólico. (Solanas, 2019)

Dependiendo de la complejidad de cada fracción del petróleo crudo, será la facilidad de degradación que poseen los microorganismos. Al derramarse en el suelo los hidrocarburos inician procesos fisicoquímicos que, al ser lentos, aumentan su toxicidad. Debido a su alta salinidad, su tratamiento es complicado, pues los microorganismos utilizados mueren por deshidratación al no metabolizarlas. (Wolicka, 2018)

Es importante mencionar que los microorganismos pueden degradar los hidrocarburos, utilizándolos como fuente única de alimento, o bien mediante el co-metabolismo: pueden alimentarse de otras moléculas como azúcares y proteínas y al mismo tiempo, de los hidrocarburos presentes en el medio. (Solanas, 2019)

De acuerdo con estudios realizados, algunos microorganismos aislados de suelos en donde ha ocurrido un derrame, independientemente del tiempo que lleve contaminado el sitio, son degradadores de petróleo. Los hidrocarburos en el medio ambiente son degradados principalmente por bacterias y hongos que poseen la capacidad peroxidasa y oxigenasa que facilitan la degradación de estos mediante ataques secundarios. (Rich, 2022)

Se han realizado diversos estudios de degradación de hidrocarburos usando cepas bacterianas, por ejemplo, en su estudio de degradación de n-alcanos (Hasanuzzaman, 2007) obtuvieron porcentajes de degradación de 51% usando una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*. Otros estudios reportan valores de degradación de n-alcanos e hidrocarburos

políciclicos superiores a 70% utilizando cepas de *Exiguobacterium aurantiacum*, *Burkholderia cepacia*, *Sphingobium indicum*, *Sphingobium japonicum*, *Staphylococcus lentus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acidovorax delafieldii*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Streptomyces*, *Stenotrophomonas maltophilia*. (Kokalis, 2016)

2.7 BACILLUS SUBTILIS

Bacillus subtilis es una bacteria Gram positiva ampliamente estudiada por su capacidad para sobrevivir en condiciones ambientales adversas. Es conocida por formar esporas resistentes, lo que le permite perdurar en entornos con pocos nutrientes o con temperaturas extremas. Esta bacteria también es un importante modelo de estudio en microbiología debido a su capacidad para degradar compuestos orgánicos y su papel en la mejora de la fertilidad del suelo, facilitando procesos de aireación y circulación de nutrientes como el oxígeno. (Earl, 2019)

2.7.1 EL GÉNERO BACILLUS

El género *Bacillus* pertenece a la familia Bacillaceae, es un género que hoy en día incluye más de 60 especies de bacilos. Este género está formado por microorganismos bacilares Gram positivos, formadores de endosporas, quimiheterótrofos que normalmente son móviles y rodeados de flagelos periticos. Son anaerobios o aerobios facultativos son catalasa positivos. Consiste en un gran número de diversas formas de bastón, Gram positivo, oxidasa y catalasa positiva. (Koneman, 2021)

Las células bacterianas de este género tienen un amplio tamaño que varía entre 0,5 a 2,5 μm x 1,2-10 μm . Este género se encuentra comúnmente en suelos y plantas donde tienen un papel importante en ciclo del carbono y el nitrógeno. Son habitantes comunes de aguas frescas y estancadas, son particularmente activos en sedimentos. (Koneman, 2021)

En los medios de cultivo líquidos crecen formando un biofilm (velo) en la superficie, capaces de producir endosporas, las cuales resisten altas temperaturas y factores físicos perjudiciales como la desecación, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químicos. (Li, 2014)

2.7.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *BACILLUS SUBTILIS*

La bacteria *Bacillus subtilis* (Figura 7), abreviada como *B. subtilis* es un microorganismo autóctono del suelo. Prospera en la naturaleza donde se encuentra ampliamente distribuida en muy diversos hábitats. Se caracteriza por ser una bacteria Gram positiva, catalasa positiva, con forma bacilar, aerobia estricto o anaerobia facultativa, que en condiciones estresantes forma una endospora central, que deforma la estructura de la célula. Produce una gran variedad de proteasas y otras enzimas que le permiten degradar una variedad de sustratos naturales. (Milić et al., 2024)

Esta bacteria es capaz de generar un efecto benéfico en el crecimiento de las plantas por diversos mecanismos, en donde se encuentran la producción de sustancias antibióticas, producción de lipopéptidos que actúan como biosurfactantes, solubilización de fosfatos y reducción de enfermedades en las plantas. (Kokalis, 2016)

Es una de las 40 especies reconocidas de *Bacillus*, que tiene la capacidad de moverse, mostrar velocidades de crecimiento altas, su reconocimiento es sencillo ya que es catalasa y Voges-Proskauer positivo, su crecimiento en agar anaerobio (agar nutritivo) es negativo y la hidrólisis del almidón es positiva. (Espinoza, 2022)

Este microorganismo no puede crecer anaeróbicamente a expensas de glucosa, probablemente porque no puede reducir la triosa fosfato a glicerol (Earl, 2019) *Bacillus subtilis* no es potencialmente patógena, no produce endotoxinas y secreta proteína al medio, algunas de ellas con propiedades antifúngicas, como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las iturinas. Se utiliza industrialmente como insecticida y fungicida. La subtilina liberada por *Bacillus subtilis* actúa sobre la pared celular de hongos. Otro punto vital es el estudio del genoma de *B. subtilis*, que es un organismo modelo de las bacterias gram-positivas, ya que abarca más de 4100 genes (de los cuales de 1700 genes se desconoce su funcionalidad) (Lisboa, 2003)

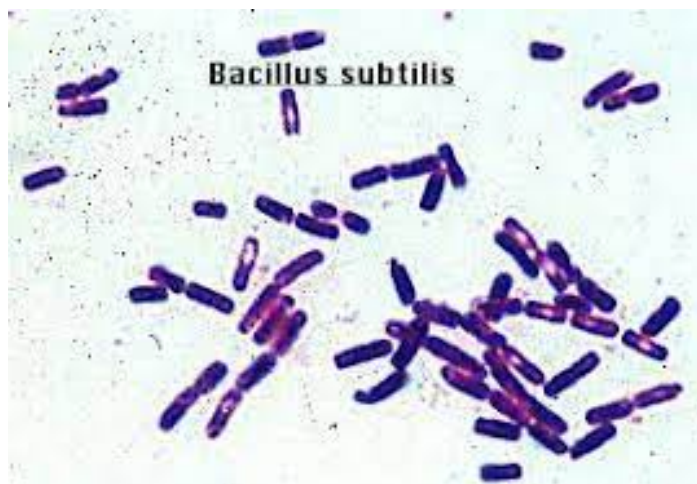


Figura 7 *Bacillus subtilis* (Lisboa, 2003)

2.7.3 CICLO DE VIDA

Las especies de *Bacillus* son células potencialmente resistentes en la parte final de la fase exponencial de crecimiento. Las células resistentes formadas intracelularmente son llamadas endosporas. Ellas difieren de las células vegetativas en refracción óptica, ultraestructura, composición química, resistencia a estrés químico y físico en donde las células vegetativas mueren rápidamente. El grado de resistencia de las endosporas depende de las condiciones ambientales bajo las cuales se forme. (D. León, 2001)

La capacidad de formar endosporas, que normalmente no es expresada durante el crecimiento vegetativo de una bacteria productora de esporas, constituye un proceso complejo de diferenciación que se inicia cuando la población acaba el crecimiento exponencial y se acerca a la fase estacionaria. Dentro de los factores que influyen para la formación de la endospora se encuentran la temperatura de crecimiento, el pH del medio de cultivo, aireación, minerales presentes, la presencia o ausencia de fuentes de carbono o nitrógeno, así como su concentración. (D. León, 2001)

(Earl, 2019) explica que bajo condiciones limitantes de nutrientes *Bacillus subtilis* genera una población mezclada de células, donde la mitad de estas activan el regulador principal para la esporulación Spo0A y la otra mitad no lo hacen. Por tanto, el significado biológico de este ejemplo es que las células que se han activado para llevar a cabo la formación de esporas buscan sobrevivir por un proceso de canibalismo que implica la matanza de las células hermanas que no han activado el regulador principal.

2.7.4 DEGRADADORA DE HIDROCARBUROS

La Recuperación Mejorada de Petróleo con Microorganismos (MEOR) tiene como principio fundamental promover que las poblaciones microbianas se nutran del petróleo, lo utilicen como fuente de carbono y lo conviertan en productos con bajo punto de ebullición (como en el caso de las naftas) que pueden actuar como solventes para asistir (a través de la disolución) en la recuperación del petróleo remanente. De esta manera el petróleo es recuperado desde las mismas bases de su formación. (Hamme, 2022)

Una de las desventajas que se le atribuyen al proceso MEOR es la percepción negativa del uso de cepas bacterianas y su manejo ante la errónea idea generalizada de que todas las especies bacterianas son peligrosas y causantes de enfermedades y por lo tanto un riesgo para la salud pública. Sin embargo, se han llevado a cabo ensayos en laboratorio en los cuales se ha reportado que los cultivos mezclados de bacterias son seguros para su manejo y no son amenazas para el medio ambiente, plantas, animales o humanos. Y si esto pudiera dejar dudas al respecto hay que tener en cuenta que las condiciones de pozo no son favorables para el crecimiento y desarrollo de organismos patógenos. (Invaquimo et al., 2020)

Para elegir a los organismos correctos en la recuperación mejorada de petróleo se tienen que tomar en cuenta muchos parámetros, Los factores físicos son muy importantes en el correcto funcionamiento fisiológico de los microorganismos. La temperatura, salinidad y presión atmosférica podrían ser considerados factores principales, siendo los demás considerados como factores secundarios. (Wolicka, 2018)

B. subtilis puede ser aislado de distintos ambientes, terrestres y acuáticos, indicando que esta especie es ubicua y bien adaptada para crecer en diversas 29 condiciones. Sin embargo, como todos los miembros del género, esta bacteria es capaz de formar endosporas altamente resistentes en respuesta a la privación de nutrientes y otras condiciones de estrés. Consistentemente con el punto de vista que esta cepa no es patógena, no se han detectado genes que codifican algún factor de virulencia conocido en el secuenciamiento de su genoma, interesantemente el genoma codifica numerosas vías para la utilización de moléculas derivadas de plantas, reforzando la idea que esta especie está en íntima asociación con las plantas. (Earl, 2019)

Diversos estudios han reportado a *B. subtilis* como una especie con gran capacidad degradativa de hidrocarburos (N. Das, 2014) (Jabeen, 2022) (Jalilzadeh, 2017)

En la revisión realizada por(Peralta-Otero, 2024), presenta una investigación que tuvo como objetivo aislar y caracterizar bacterias marinas cultivables degradadoras de hidrocarburos de las áreas de extracción y perforación de petróleo de la plataforma CX-11 en Tumbes. Menciona que se obtuvieron las muestras de agua de la línea costera, que posteriormente purificaron. El ensayo fue llevado a cabo con 27 cepas para desarrollar la biodegradación in situ. Se observó que las bacterias *Bacillus cereus* (98 y 147) y *Bacillus subtilis* (124) mostraron el mayor poder degradador de petróleo, seguidas del consorcio de las mismas cepas con un poder intermedio y por último las cepas de *S. epidermidis* (123) y *Pantoea dispersa* (176) con el menor poder. produjeron una biodegradación mayor al 99% del petróleo, mostrando su alto poder degradador.

2.8 GRAFENO

El grafeno es una lámina de carbono de un solo átomo de grosor con una estructura cristalina hexagonal. Se explora su uso en aplicaciones que van desde baterías más eficientes y pantallas táctiles flexibles, hasta mejoras en el transporte y la medicina gracias a su versatilidad y eficiencia. (Tang, 2020)

2.8.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

El grafeno es un nanomaterial bidimensional, consistente en una sola capa de átomos de carbono. A pesar de ser tan fino y ligero, es el material más fuerte que se conoce en la naturaleza, con una resistencia 200 veces superior al acero estructural con el mismo espesor. Es elástico, prácticamente transparente y posee una alta conductividad térmica y eléctrica. Además de sus propiedades mecánicas, tiene increíbles propiedades electrónicas, químicas, magnéticas y ópticas. (Calle, 2017)



Figura 8 Estructura del grafeno(Calle, 2017)

Este compuesto forma estructuras laminares, alótropos del carbono y están constituidas por átomos de carbono densamente empaquetados en una red cristalina en forma de panal (Figura 8). Cuentan con varios átomos de grosor; sus enlaces son de tipo covalente que se forman a partir de la superposición de los enlaces de carbono con hibridación sp^2 . (Ávila, 2013)

Con excepción del diamante, el grafeno puede visualizarse como el bloque constructor a partir del cual se forman todos los demás alótropos; este plano bidimensional puede ser envuelto a manera de forro de un balón proporcionando fullerenos; enrollado cilíndricamente para formar nanotubos o superpuesto tridimensionalmente para producir grafito. La estabilidad en su estructura laminar, el arreglo hexagonal casi libre de defectos o impurezas y las interacciones de los electrones desplazándose a través de esta planicie bidimensional se han visto reflejadas en un conjunto de propiedades, sobre todo electrónicas, que hacen del grafeno un material único. (Mártinez, 2015)

Que el grafeno tenga el espesor de un átomo (monocapa) significa que es extremadamente fino (estaríamos hablando de 0.00000000001 metros, o bien, 0.0000001 milímetros), de modo que parece que solo posee las otras dos dimensiones: la longitud y la anchura, puesto que la tercera, la altura, es tan sumamente pequeña. De ahí que se le considere un material bidimensional. El único material bidimensional que es capaz de mantenerse estable hasta con el grosor de un átomo. (Ávila, 2013)

Podemos decir que es grafeno si comprende desde una capa de un átomo de espesor hasta 10 de estas capas superpuestas. Si lo observáramos a través de un microscopio, veríamos cómo estos átomos de carbono permanecen ordenados en forma de hexágonos planos, fuertemente enlazados y dispuestos en una superficie uniforme de ligera ondulación, con una apariencia que recuerda a la de un panal de abejas.(Huang et al., 2020)

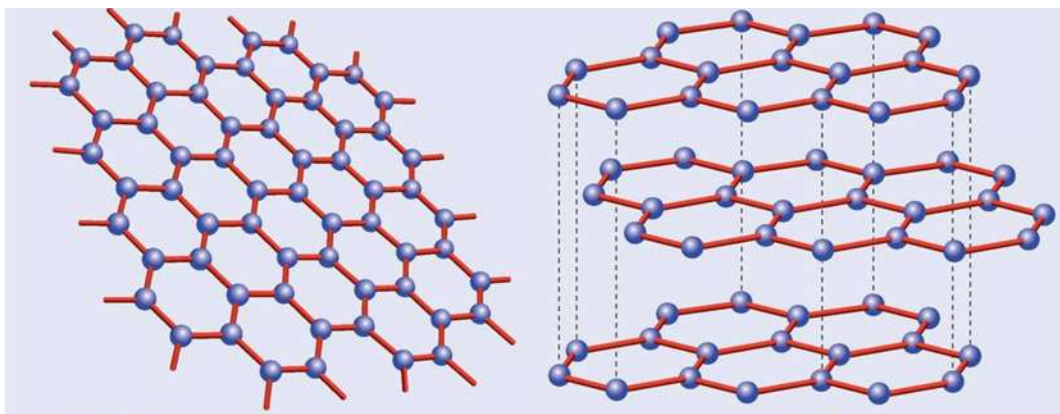


Figura 9 Estructura del grafeno y grafito (Urcuyo et al., 2021)

2.8.2 PROPIEDADES

El grafeno por definición posee unas características muy interesantes, algunas absolutamente asombrosas. Además de su extrema delgadez, lo que le hace ser transparente y al mismo tiempo muy flexible, es uno de los materiales más duros y resistentes. El grafeno también es transcendental por las increíbles propiedades térmicas, electrónicas, ópticas y mecánicas que presenta. Estas propiedades junto a la abundancia de carbono en la naturaleza han hecho al grafeno ganarse el sobrenombre de “material del futuro” o “material de Dios. (Huang et al., 2020)

Entre sus aplicaciones más prometedoras están en la fabricación de transistores de nueva generación y pantallas táctiles y flexibles.

2.8.2.1 PROPIEDADES ELECTRÓNICAS DEL GRAFENO

El grafeno puede delinearse como una superficie plana compuesta de un arreglo hexagonal de átomos de carbono con una hibridación del tipo sp^2 ; este tipo de hibridación dirige a una estructura trigonal plana en el que cada átomo de carbono forma un enlace covalente σ con otros tres átomos vecinos separados a $1.42 \text{ \AA}$. El orbital $2p_z$ remanente puede visualizarse como un par de lóbulos orientados perpendicularmente hacia el plano, lo que origina un solapamiento lateral entre éstos dando lugar a un estado electrónico no localizado denominado sistema π . El electrón que se encuentra en estos orbitales está débilmente ligado,

permitiendo saltar de orbital a orbital tomando la forma de una distribución electrónica continua por arriba y por abajo del plano del grafeno movilidad de los electrones π deslocalizados en las direcciones paralelas al plano es lo que determina las propiedades electrónicas de este material. (Castro, 2011)



Figura 10 Electrones deslocalizados del grafeno (Castro, 2011)

Las propiedades eléctricas de un material sólido dependen en detalle de su estructura de bandas, es decir, el arreglo de las bandas electrónicas más externas y de la forma en la cual éstas son ocupadas con electrones. Con base en lo anterior, existen tres clases principales de estructuras de bandas en los sólidos: la estructura correspondiente a los materiales metálicos, a los aislantes y a los semiconductores. (Callister, 2007)

En la Figura 9 se representan las estructuras de bandas de los materiales sólidos arriba puntualizados. La forma lila representa la banda de conducción y la forma morada la banda de valencia. En estos materiales metálicos la banda de conducción y la de valencia se solapan. En los aislantes aparece una banda prohibida que dificulta el libre desplazamiento de los electrones de una banda a otra. La estructura de bandas en los semiconductores es la misma que en los aislantes con la excepción de que la brecha energética es relativamente angosta. (Carmona, 2012)

El grafeno presenta un comportamiento poco convencional. Definido como un semiconductor con banda prohibida cero al igual que los metales. En cuanto a los materiales semiconductores, comparte con ellos ambos tipos de transportadores de carga: electrones y huecos. Este material híbrido entre metal y semiconductor debe muchas de sus propiedades a esta estructura electrónica de bandas. (Castro, 2011)

El grafeno presenta una forma de banda poco convencional que le confiere propiedades electrónicas que le permiten situarse entre los metales y los semiconductores. (Castro, 2011)

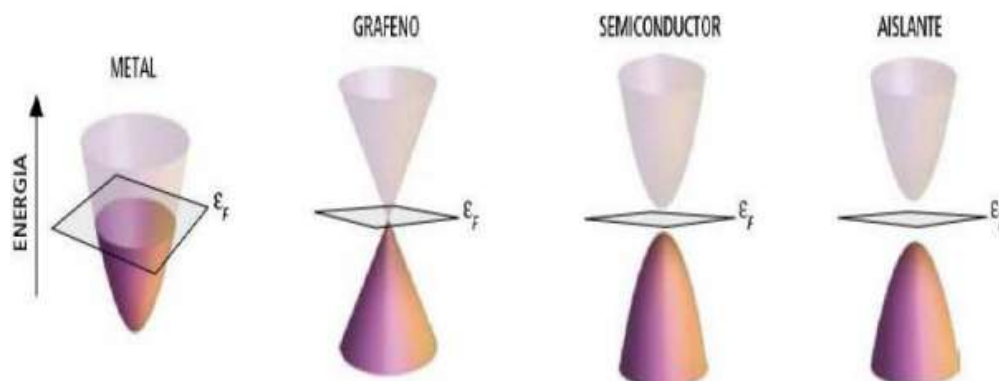


Figura 11 Estructura de bandas electrónicas para metales, semiconductores, aislantes y grafeno (Carmona, 2012)

2.8.3 APLICACIONES

El grafeno presenta una diversidad de propiedades excepcionales que le permiten abrir nuevas expectativas en el campo de la ciencia aplicada.

Debido a que las muestras de grafeno presentan una elevada movilidad electrónica a temperatura ambiente y una muy baja densidad de defectos en su estructura cristalina, el grafeno ha sido integrado en dispositivos sensores de gases. Las ventajas que estos sensores presentan son elevada sensibilidad, tiempo de respuesta rápido y bajo consumo de energía. (J. & D, 2011)

Otra aplicación del grafeno consiste en utilizarlo como biosensor aprovechando su elevada área superficial y la excelente conductividad eléctrica que presenta. Estas características permiten que actúe como un alambre electrónico que facilita la unión entre el centro activo de una enzima o proteína y la superficie de un electrodo, mejorando la rapidez de transferencia electrónica, por lo tanto, aumentando la detección selectiva de biomoléculas. (Rodríguez, 2018)

La fiabilidad y la rapidez de los dispositivos optoelectrónicos dependen de la temperatura, por tanto, es necesario contar con materiales con conductividades térmicas muy elevadas para disipar eficientemente el calor generado en esos dispositivos. El grafeno dispone de una conductividad térmica muy elevada que lo hace un conductor de mejor calidad comparado con el silicio y esta característica permita perfilar aplicaciones en transistores o circuitos que trabajen de manera más rápida y en componentes más pequeños. (Rodríguez, 2018)

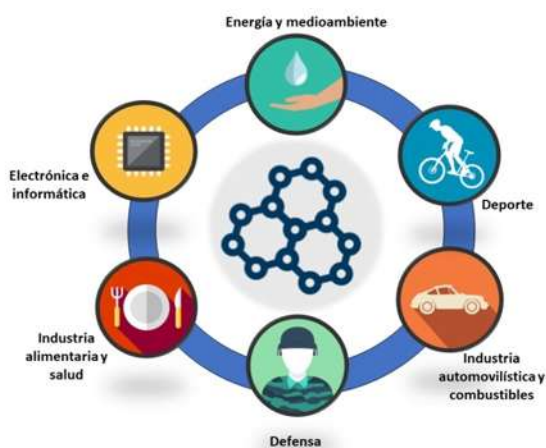


Figura 12 Aplicaciones del óxido de grafeno en distintas áreas (Huang et al., 2020)

2.8.3.1 APLICACIONES EN SISTEMAS BIOLÓGICOS

El óxido de grafeno, gracias a su particular estructura y propiedades, ha demostrado ser de gran utilidad en diversas aplicaciones a nivel biomédico, siendo todavía un material en estudio en muchos campos que competen a la medicina, la farmacología o la bioquímica y que está demostrando ser muy prometedor en estas áreas. (García-Guirado, 2020)

En los últimos años el óxido de grafeno y sus derivados funcionalizados han mostrado tener gran potencial para bioaplicaciones por las siguientes razones: (Solís-Pérez, 2022)

- El OG tiene una gran área superficial que le permite absorber o bioconjugarse de manera eficiente moléculas y polímeros funcionales, convirtiéndolo en un material biocompatible. (Martín et al., 2019)
- Se ha demostrado que el OG es un material que presenta baja toxicidad. En estudios *in vitro* no se han mostrado efectos citotóxicos del OG en el interior de las células. (Guo, 2021)
- Además, el OG presenta una excelente biodegradabilidad, pues las enzimas oxidativas (es decir, las peroxidasas) son capaces de catalizar la degradación del óxido de grafeno. (Martín et al., 2019)
- En particular, el uso del óxido de grafeno es frecuentemente utilizado para aplicaciones biomédicas, debido que sus dimensiones le permiten formar dispersiones más homogéneas y estables. (Nanda, 2018)

Desde su descubrimiento, muchos científicos están trabajando activamente en su aplicación en el diseño de materiales para ensado químico/biológico, catálisis, optoelectrónica y surface-enhanced Raman scattering (SERS), por mencionar sólo algunas. Pero poco se ha explorado en el campo de los efectos que posee el grafeno sobre bacterias formadoras de biofilms en materiales de importancia industrial y patrimonial. (Garcia-Guirado, 2020)

En el área microbiológica existen diversos estudios sobre la toxicidad y la interacción con los microorganismos de algunos derivados del grafeno, como el óxido de grafeno o el óxido de grafeno reducido; pero son pocos los estudios que en este sentido existen sobre este material, enfatizándose, en cualquier caso, la influencia tanto de la concentración como de la forma del nanomaterial en sus propiedades bacteriológicas. (Turcheniuk, 2019)

Recientemente, se informó que películas de grafeno producidas por CVD sobre Cu o Ge, o transferido a SiO₂ posee actividad de aumento bacteriano (figura 12) que estaría relacionada con las propiedades electrónicas del sustrato. (Viera, 2015)

El futuro desarrollo de estas aplicaciones aumenta las probabilidades de interacción del grafeno con el cuerpo humano, el medio ambiente y los microorganismos, por lo tanto, es necesario el estudio de su impacto medioambiental y toxicológico. (Giulio et al., 2018; Wang et al., 2019)

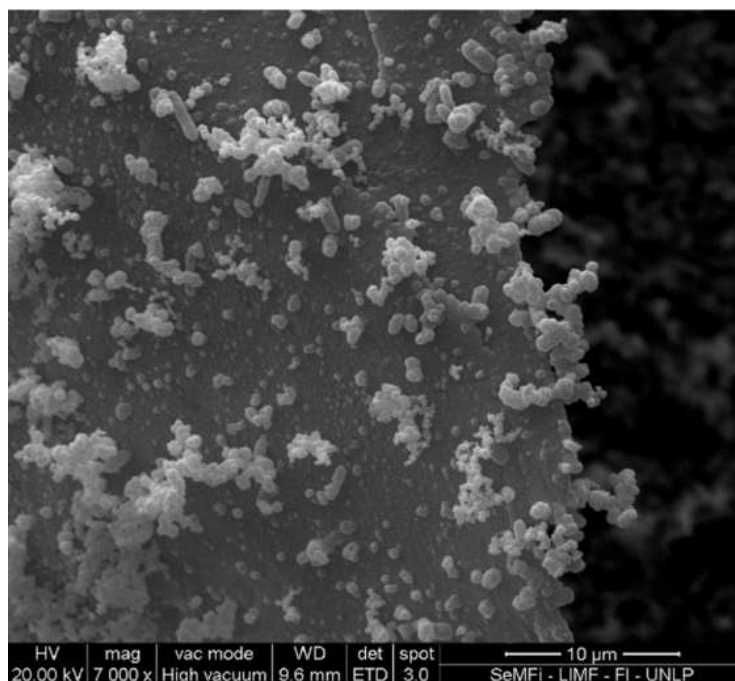


Figura 13 *Pseudomonas* sp sobre acero SAE 1010 con película de grafeno (Viera, 2015)

3. METODOLOGÍA

A continuación, se describen los procedimientos experimentales llevados a cabo para cumplir con los objetivos de la presente investigación. El enfoque metodológico adoptado está diseñado para evaluar la efectividad del óxido de grafeno (OG) funcionalizado con nitrógeno como promotor del crecimiento de *Bacillus subtilis* en la degradación de hidrocarburos, específicamente aceite vehicular usado, a través de un proceso de electrobiorremediación.

3.1 ÓXIDO DE GRAFENO

El óxido de grafeno (OG) es una versión oxidada del grafeno con grupos funcionales oxigenados que le otorgan alta dispersabilidad en agua y facilidad de modificación química. Destaca por su conductividad eléctrica ajustable y gran área superficial, siendo útil en sensores y catálisis. En biorremediación, el OG actúa como soporte para bacterias, facilitando la degradación de hidrocarburos. Su funcionalización con nitrógeno mejora estas interacciones, optimizando procesos como la electrobiorremediación de suelos contaminados. (Milić et al., 2024)

3.1.1 SÍNTESIS DE ÓXIDO DE GRAFENO

Para la elaboración de óxido de grafeno (OG) se utilizó el método de Hummers modificado. En un vaso de precipitado de 1L, se añadieron 70 mL de H_2SO_4 y 3 g de grafito; posteriormente se añadieron 9 g de $KMnO_4$ sin que la mezcla sobrepase $20^\circ C$, se agitó la mezcla durante 10 min; la mezcla se mantuvo en agitación en un baño de aceite durante 30 min a $40^\circ C$ (Figura 14)



Figura 14 Solución para sintetizar OG en baño de aceite a $40^\circ C$

Trascurrido el tiempo se agregaron 150 mL de agua (la solución tornó a un color marrón) y se agitó durante 15 min a 95°C. Finalmente se añadieron 500 mL de agua y lentamente se agregaron 15 mL de H_2O_2 y se agitó la solución durante 10 min. La neutralización de la solución anterior se llevó a cabo con una solución de 250 mL de HCl al 10%, se lavó y centrifugó con agua hasta un pH neutro. Finalmente se secó a 90°C durante 24 h en una estufa. (Figura 15)



Figura 15 OG posterior al secado a 90°C



Figura 16 Óxido de grafeno obtenido

3.1.2 IMPURIFICACIÓN DEL ÓXIDO DE GRAFENO CON NITRÓGENO

Se tomaron 0.1 g de OG al cual se le agregó directamente una solución al 4M del precursor de nitrógeno (etilendiamina, urea o tiourea), agitando durante 10 min. Posteriormente se colocó en un baño de ultrasonido durante 30 min y se llevó a reactor de microondas Synthos 300 Anton Parr (Figura 17) bajo las siguientes condiciones, temperatura : 90 °C, tiempo de reacción: 20 min de reacción, rampa de calentamiento :5 °C/min. Finalmente se lavó con agua destilada hasta un pH neutro (Figura 18), se secó a 100 °C durante 24 h.



Figura 17 Horno de Microondas Synthos 300



Figura 18 Lavados con agua del OG

3.1.3 CARACTERIZACIÓN

Tras obtener las distintas muestras de OG impurificado deseado se realizaron estudios de morfología y análisis químico de las muestras mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) en un sistema JEOL JSM 5300 (Figura 19), acoplado con un analizador dispersivo de energía (abreviado como EDS o EDAX), operando a 20 kV y 10⁻⁶. El análisis por MEB permitió apreciar la superficie de la muestra, obteniéndose imágenes a diferentes escalas, con lo cual se llevó a cabo el estudio de la morfología de las muestras. Al mismo tiempo, se realizó el análisis de la composición química.



Figura 19 MEB JEOL JSM 5300 utilizado en la caracterización

También se determinó la composición elemental mediante la espectroscopia de fotoemisión de rayos X (XPS), la cual es empleada para determinar el estado químico y la composición superficial de los materiales sólidos, Esta técnica permitió diferenciar distintos estados de oxidación de átomos de las muestras analizadas, así como el estudio de su composición. El equipo utilizado fue un espectroscopio de fotoelectrones de rayos X K-Alpha Thermo

Scientific, con una fuente de rayos X proveniente de un monocromador de $\text{AlK}\alpha$ y un área de análisis de 400 μm . (Figura 20)

La muestra fue colocada sobre cinta de cobre y pegada al portamuestras del equipo. Una vez dentro del equipo a condiciones de ultra alto vacío, se procedió a hacer una erosión de la superficie con iones de Argón de 1 kV por 15 s para eliminar impurezas superficiales y al terminar se procede a realizar el análisis.



Figura 20 Espectroscopio de fotoelectrones de rayos X K-Alpha Thermo Scientific utilizado para la caracterización

3.2 AGUA

El agua, compuesta por hidrógeno y oxígeno (H_2O), es esencial para la vida y los procesos biológicos al actuar como solvente universal. Se encuentra en la naturaleza en tres estados (sólido, líquido y gas) y es clave en ciclos como el del agua. También es crucial en procesos industriales y ambientales, donde métodos como la biorremediación y la electrorremediación se utilizan para tratar agua contaminada, eliminando o transformando contaminantes en productos menos tóxicos. (Mendoza, 2017)

3.2.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRA

Se tomó la muestra según lo indica la norma NOM-128-SSA1-2021, donde se abrió el grifo de la llave del laboratorio de investigaciones ambientales del Instituto Tecnológico del Valle de Morelia; se dejó caer un chorro de agua durante 5 minutos aproximadamente; posteriormente en un envase de vidrio con taparrosca se tomó 1 L de muestra.

3.2.2 CARACTERIZACIÓN

Primero se realizaron las pruebas sensoriales las cuales solo fueron color y olor; después se midieron pH, conductividad, turbidez y temperatura con el multiparámetro Eutech PC 450.

3.3 SUELO

El suelo, compuesto por minerales, materia orgánica, agua, aire y organismos vivos, es esencial para el crecimiento de plantas, regula el ciclo del agua y nutrientes, y proporciona hábitat para microorganismos. Puede contaminarse con sustancias dañinas, afectando su función. La remediación, como la biorremediación y la electrorremediación, busca restaurar su calidad y minimizar impactos ambientales. En resumen, el suelo es un recurso vital que necesita protección para mantener su función ecológica y productiva. (Jabeen, 2022)

3.3.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRA

El muestreo se llevó a cabo siguiendo las indicaciones que especifica la norma NMX-AA-132-SCFI-2016. Se tomó en el Instituto Tecnológico del Valle de Morelia. Donde se tomaron 5 puntos en una superficie cuadrada de 2 m por lado tal como se observa en la Figura 21 en las siguientes coordenadas 19.750°N, 101.16319°O



Figura 21 Sitio de muestreo de suelo

3.3.2 PRETRATAMIENTO A LA MUESTRA

Una vez que se obtuvo la muestra se extendió en charolas y posteriormente se retiró materia grande (piedras, hojas, basura, etc.) (Figura 22); se dejó secar durante 48 horas para después trituras la muestra en un mortero y finalmente colar por tamiz de 2 mm de diámetro (malla del 10)



Figura 22 Muestra de suelo tamizada y categorizada

3.3.3 CARACTERIZACIÓN

Se realizaron las pruebas de:

- Densidad aparente (método de la probeta)
- Densidad real (método de la probeta)
- Textura (método del hidrómetro de Boyucos)
- Materia orgánica
- pH
- Conductividad

Los últimos 2 parámetros fueron determinados por el pHmetro multiparámetro HI 5521 marca HANNA.

3.4 MATERIAL BIOLÓGICO

La cepa *B. subtilis* DSM 29784 (BS 29784) utilizada para las pruebas fue obtenida mediante un laboratorio que tenía la cepa aislada. Se mantuvo en refrigeración en glicerol y en medio agar/peptona/caseína.

3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se planificaron una serie de pruebas controladas con el fin de determinar el impacto de diferentes condiciones en el crecimiento y actividad de *Bacillus subtilis* durante el proceso de biorremediación. Se establecieron variables independientes y dependientes, y se seleccionaron los materiales, reactivos y equipos necesarios para medir la efectividad de los tratamientos aplicados, con especial énfasis en la reproducibilidad y precisión de los resultados obtenidos bajo las condiciones experimentales planteadas.

3.5.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO

Se realizaron mediciones periódicas de la densidad óptica a lo largo del tiempo para evaluar el crecimiento de *Bacillus subtilis*. Las muestras se incubaron bajo condiciones controladas, y se tomaron lecturas de absorbancia en intervalos regulares utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda específica. Estos datos permitieron determinar la tasa de crecimiento bacteriano en respuesta a diferentes tratamientos, proporcionando una visión detallada de cómo varían las poblaciones microbianas en función de las condiciones experimentales aplicadas. (Wang et al., 2019)

3.5.1.1 ADAPTACIÓN DEL INÓCULO

Se tomó una azada de la cepa, la cual fue añadida en medio de cultivo nutritivo enriquecido con peptona, NaCl y levadura de maíz, previamente esterilizado. Fue incubado durante 24 h a 35°C

3.5.1.2 PREPARACIÓN DE MATERIAL

En 6 matraces Erlenmeyer se prepararon 100 mL de medio de cultivo formulado de la misma manera indicada en la adaptación el inóculo. A un matraz se le agregaron 0.050 g de OG natural; en un matraz distinto se añadió el OG impurificado con urea. Este proceso se repitió con cada uno de los precursores restantes (tiourea, etilendiamina e hidrazina). El sexto matraz únicamente contenía el medio de cultivo y se considera como el blanco de referencia. Se

empaquetaron los materiales necesarios incluyendo los medios de cultivo para llevar a esterilizar en una autovlave Chromalox® durante 15 min a 1.5 atm.

3.5.1.3 CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO

En un área completamente estéril (Figura 23), se tomaron 100 μ L del medio de cultivo que contiene el inóculo adaptado, los cuales fueron añadidos a los 6 matraces. La curva de crecimiento bacteriano se basó en tomar una alícuota de las muestras las cuales se congelaban (Figura 25), midiendo la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro Jenway® (Figura 24) considerando tiempos de 1,2, 4, 8, 12, 24, 27, 30 y 48 horas. Los matraces se encontraron siempre en incubación con agitación a 35°C.



Figura 23 Medios de cultivo en área estéril



Figura 24 Medición de absorbancia en medio de cultivo



Figura 25 Alícuotas tomadas de cada medio de cultivo congeladas

3.5.2 CONTEO EN CÁMARA DE NEUBAUER

El conteo se llevó a cabo tras la toma de muestras (200 µL) de cada lectura después de determinar la densidad óptica. En una cámara de Neubauer se agregaron 25 µL de muestra y 25 µL de azul de tripano (Figura 26), colocando el cubreobjetos sin generar burbujas y llevando a microscopio (Figura 27) para poder comenzar el conteo en cada cuadrante.

Para determinar el número de células viables se utilizó la siguiente fórmula:

$$mo\ por\ mL = \left(\frac{1}{vol.\ cuadro} \right) (prom.\ mo\ contados)(fact.\ dilución)$$



Figura 26 Medio de cultivo con azul de tripano en CN



Figura 27 Muestra en CN bajo montada en microscopio

3.6 CELDA ELECTROQUÍMICA

Se utilizó una celda diseñada específicamente para llevar a cabo experimentos de biorremediación asistida electroquímicamente. La celda consistía en un sistema de electrodos sumergidos en un medio acuoso que contenía *Bacillus subtilis* y los contaminantes objetivo, como el aceite vehicular usado. Los electrodos se conectaron a una fuente de corriente eléctrica controlada, y se aplicaron diferentes voltajes para evaluar cómo influye la corriente en la eficiencia del crecimiento bacteriano y la degradación de los hidrocarburos.

3.6.1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Se elaboró una solución de 100 mL de acetato de polivino (PVA) al 5% y otra solución de 100 mL de monoetilenglicol con un porcentaje de pureza de 99%. A ambas soluciones (PVA y monoetilenglicol) se adicionaron 0.050 g de OG.

3.6.2 MÉTODO DE INMERSIÓN

Con un alambre de cobre se unió el electrodo de grafito con medidas de 4 cm de largo con diámetro de 0.5 cm a un cable de estaño de un polo positivo, tal como se muestra en la Figura 28. Este proceso se repitió con el cable de polo negativo. Una vez unidos los electrodos a los cables se sumergieron en la solución de PVA, posteriormente se dejaron escurrir para retirar el exceso (Figura 29), finalmente se llevó a estufa por 7 minutos a 150°C (Figura 30), para sumergir nuevamente en la solución. Este proceso se repitió por 3 veces, consecutivamente. Este proceso se repitió empleando la solución de monoetilenglicol.



Figura 28 Electrodo de grafito unido a cable de estaño

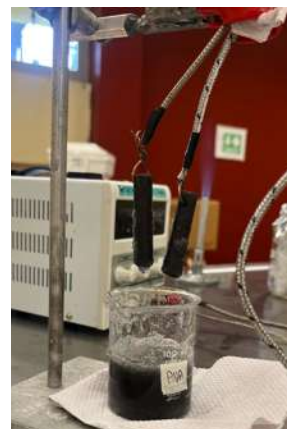


Figura 29 Electrodo escurriendo exceso de solución



Figura 30 Electrodo seco en estufa

3.6.3 PROCESO ELECTROQUÍMICO

Los cables que se encuentran unidos a los electrodos previamente tratados fueron conectados a una fuente de alimentación estabilizadora Thxbyebye® modelo QW-MS3010D (Figura 31) en los polos correspondientes. En un área completamente estéril fueron añadidos 100 μ L de un inóculo de *B. subtilis* previamente adaptado a los matraces con medio nutritivo enriquecido estéril. Fueron sumergidos los electrodos de grafito recubiertos dentro del matraz que contenía el medio de cultivo con la bacteria; se seleccionaron los valores de trabajo de 1.5 V durante 10 segundos (Figura 32). Posteriormente se inició el suministro de energía eléctrica dando lugar al inicio de la curva de crecimiento bacteriano, la cual se siguió por 120 horas. Los tiempos considerados para toma de muestra fueron 0, 4, 8, 12, 24, 30, 48, 72, 96 y 120 h. Posteriormente se llevó el conteo de las bacterias empleando la cámara de Neubauer (procesos explicados previamente en los puntos 7.3.1 y 7.3.2)

El proceso fue elaborado con la solución de PVA, monoetilenglicol y con un electrodo sin tratamiento alguno.



Figura 31 Fuente de energía Thxbyebye®



Figura 32 Celda electroquímica

3.7 EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DEL HIDROCARBURO

Se emplearon métodos analíticos para cuantificar la reducción del hidrocarburo presente en los medios de cultivo. Se realizaron mediciones periódicas de los compuestos antes y después del tratamiento, utilizando la técnica de arrastre de grasas y aceite por método Soxhlet para determinar la concentración de los hidrocarburos degradados. Los resultados obtenidos permitieron evaluar la eficiencia del proceso de biorremediación, considerando la influencia del grafeno funcionalizado con nitrógeno y las condiciones electroquímicas aplicadas.

3.7.1 ACEITE DE AUTOMOTOR UTILIZADO

El aceite para motor usado fue BARDAHL® multigrado SAE 25W-50 API SL; obtenido por recuperación de auto propio (Figura 33) con las características mencionadas en la Tabla 4.

Tabla 4 Características del vehículo del que se recuperó el aceite usado.

MODELO	Chevy C2 2008, 1.6 TDI
MARCA	Chevrolet
KILOMETRAJE	184,817 km
PERIODO DE USO	5,000 km



Figura 33 Vehículo de donde se recuperó el aceite usado

3.7.2 PROCESO ELECTROQUÍMICO

Se elaboraron 100 mL de medio de cultivo nutritivo enriquecido y adicionado con 0.5 mL de aceite de automotor usado. Se inoculó con 100 μ L de *B. subtilis* previamente adaptado.

Una vez inoculado se inició el proceso electroquímico siguiendo la misma metodología descrita en el apartado 3.6.3, utilizando solamente la solución de monoetilenglicol al 99%.

Transcurridas las 100 horas se dejó incubando durante 11 días más a 35°C, para completar un total de 15 días de incubación.

3.7.3 DETERMINACIÓN DE GRASAS Y ACEITES TOTALES

Se determinó el porcentaje de grasa y aceites. La metodología no es específica de una sustancia particular, sino de un grupo de sustancias con las mismas características fisicoquímicas (solubilidad) y se basa en la adsorción de grasas y aceites.

3.7.3.1 PRETRATAMIENTO PARA MUESTRA LÍQUIDA

Una vez transcurridos los 15 días desde el momento de la inoculación se midió el volumen del medio de cultivo y se le añadió aluminio tricálcico (celita) sabiendo que por cada 100 mL de muestra se añaden 40 g de celita. Una vez realizada la mezcla, con ayuda de una bomba de vacío (Figura 34), se separó la parte líquida de la sólida.



Figura 34 Matraz Kitasato con bomba de vacío para separar la parte sólida de la líquida

3.7.3.2 MÉTODO SOXHLET

Una vez terminado el pretratamiento, se recuperó la parte sólida y se llevó a un sifón tipo Soxhlet que contenía un dedal de extracción de celulosa y fue cubierto con una gasa. En un matraz bola de fondo plano se agregaron 100 mL de hexano, el cual fue colocado sobre una plancha a una temperatura de 70-80°C (Figura 35). Una vez que el hexano empieza a hacer ciclos cada 3 minutos, se empieza un conteo de 8 horas (mínimamente). Después de que transcurrió el tiempo correspondiente se dejó enfriar durante 15 horas. Tras terminar la extracción se retiró el matraz del equipo y destiló para separar el hexano de la muestra, tal como se muestra en la Figura 36. Finalmente, el equipo se desmontó y se llevó la muestra a horno a temperatura de 60-70 °C para secarse y determinar el peso constante (Figura 37). Por diferencia de peso inicial y final, se obtuvo el porcentaje de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de aceite degradado} = \frac{\text{Peso del aceite inicial} - \text{Peso del aceite final}}{\text{Peso del aceite inicial}} \times 100$$



Figura 35 Equipo Soxhlet montado y operando



Figura 36 Equipo de destilación para separar el hexano de la muestra

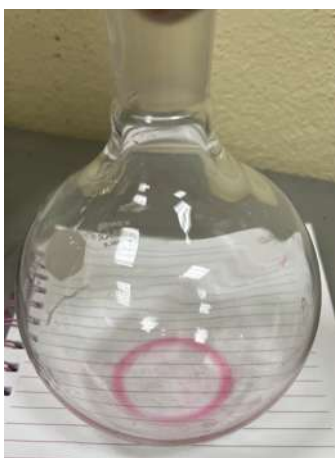


Figura 37 Aceite recuperado tras llegar al peso constante.

3.8 EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DEL HIDROCARBURO EN AGUA

Se decidió realizar esta prueba con diferente proporción del medio de cultivo para observar si al estresar, es decir reducirle el “alimento” a la bacteria se logra generar una mayor degradación del aceite.

3.8.1 PREPARACIÓN DE MATERIAL

Se elaboraron 4 distintos medios de cultivo. A todas las soluciones se añadieron 0.5 mL de aceite vehicular usado.

- Blanco: 100 mL de agua destilada con medio de cultivo al 100%
- M1: 100 mL de agua de grifo con medio de cultivo enriquecido con al 100%
- M2: 50 mL de agua de grifo con medio de cultivo enriquecido al 50%
- M3: 80 mL de agua de grifo con medio de cultivo enriquecido al 20%

Se empaquetaron los materiales necesarios incluyendo los medios de cultivo para llevar a esterilizar en una autovlave Chromalox® durante 15 min a 1.5 atm.

3.8.2 PROCESO ELECTROQUÍMICO

Se inocularon con 100 μ L de *B. subtilis* previamente adaptado los medios de cultivo anteriormente mencionados. Una vez inoculado el medio se inició el proceso electroquímico de acuerdo con la metodología descrita en el apartado 3.6.3, utilizando una solución de PVA al 1% con 0.050 g de OG natural. Se mantuvieron en incubación por 15 días A 35 °C (Figura 38). Durante ese tiempo cada 24 horas se obtuvieron muestras para poder determinar la cinética de crecimiento bacteriano, y así mismo, llevar a cabo un conteo en cámara de Neubauer.



Figura 38 Medios de cultivo en diferentes proporciones con aceite vehicular usado tras ser incubados 15 días

3.8.3 DETERMINACIÓN DE GRASAS Y ACEITES TOTALES

Se llevó a cabo el pretratamiento de las muestras líquidas la técnica es análoga a la explicada en el punto 3.7.3.1; teniendo la muestra lista comienza el proceso de arrastre de grasas por el método Soxhlet explicado el cual es equivalente al presentado en la sección 3.7.3.2



Figura 39 Aceite recuperado en cada medio de cultivo a diferente proporción tras obtener peso constante

3.9 EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DEL HIDROCARBURO EN SUELO

Esta prueba fue llevada a cabo para determinar la cantidad, expresada en gramos, de tierra que puede funcionar eficientemente en la degradación del hidrocarburo por cada 100 mL de medio de cultivo con bacteria.

3.9.1 PREPARACIÓN DE MATERIAL

Se elaboraron 4 distintos medios de cultivo. Todas las soluciones contenían 100 mL de medio de cultivo y 0.5 mL de aceite vehicular usado.

- M1: 10 g de suelo (esta muestra no pasó por el proceso electroquímico)
- M2: 10 g de suelo
- M3: 50 g de suelo
- M4: 100 g de tierra

Se empaquetaron los materiales necesarios incluyendo los medios de cultivo para llevar a esterilizar en una autoclave Chromalox® durante 15 min a 1.5 atm.

3.9.2 PROCESO ELECTROQUÍMICO

Se inocularon con 100 μ L de *B. subtilis* previamente adaptado los medios de cultivo anteriormente mencionados. Una vez inoculado se inició el proceso electroquímico empleado en la metodología descrita en el apartado 3.6.3, utilizando una solución de PVA al 1% con 0.050 g de OG natural. La muestra M1 no fue considerada para el proceso electroquímico. Se dejaron en incubación a 35 °C durante 15 días (Figura 40)



Figura 40 Medios de cultivo con muestra de suelo y OG natural tras 15 días de incubación

3.9.3 DETERMINACIÓN DE GRASAS Y ACEITES TOTALES

La M4 fue dividida en 2 procedimientos Soxhlet (50 g y 50 g) ya que no cabía toda la muestra dentro de un solo dedal; obteniéndose así las muestras denominadas como M4.1 y M4.2. Se realizó el proceso de arrastre de grasas replicando la metodología expuesta la sección 3.7.3.2.



Figura 41 Aceite obtenido tras Soxhlet en M1 y M2



Figura 42 Aceite obtenido tras Soxhlet en M3, M4.1 y M4.2

3.10 EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DEL HIDROCARBURO EN SUELO UTILIZANDO ÓXIDO DE GRAFENO IMPURIFICADO CON HIDRAZINA

Esta prueba se realizó debido a que se observó un aumento en el crecimiento de bacterias que se encontraban en contacto con el OG impurificado con hidrazina. Por lo que se propone esta prueba con el propósito de averiguar si existe un mayor porcentaje de degradación, lo que daría lugar a un aumento en el número de bacterias en el medio.

3.10.1 PREPARACIÓN DE MATERIAL

Se elaboraron 4 distintos medios de cultivo. Todas las soluciones contenían 100 mL de medio de cultivo y 0.5 mL de aceite vehicular usado. Se realizaron por duplicado; es decir se obtuvieron 8 medios en total.

- M1: 10 g de suelo (esta muestra no pasó por el proceso electroquímico)
- M2: 10 g de suelo
- M3: 50 gr de suelo
- M4: 100 g de tierra

Se empaquetaron los materiales necesarios incluyendo los medios de cultivo para llevar a esterilizar en una autovlave Chromalox® durante 15 min a 1.5 atm.

En la Tabla 5 se especifica la identificación empleada para las 8 muestras, los días que se mantuvieron en incubación y se identifican las muestras a las cuáles se añadió energía eléctrica.

Tabla 5 Muestras de celda electroquímica

INCUBACIÓN	MUESTRA	ENERGÍA ELÉCTRICA
7 días	M1.7	×
	M2.7	✓
	M3.7	✓
	M4.7	✓
15 días	M1.15	×
	M2.15	✓
	M3.15	✓
	M4.15	✓

3.10.2 PROCESO ELECTROQUÍMICO

Se inocularon con 100 μ L de *B. subtilis* previamente adaptado. Una vez inoculado se inició el proceso electroquímico el cual es idéntico al apartado 3.6.3, utilizando una solución de PVA al 1% con 0.050 g de OG impurificado con hidrazina. Las M1.7 y M1.15 no fueron sometidas a un proceso electroquímico. Se dejaron en incubación a 35 °C durante 7 (Figura 43) y 15 días (Figura 44), respectivamente.



Figura 43 Medios de cultivo con suelo tras 7 días de incubación



Figura 44 Medios de cultivo con suelo tras 15 días de incubación

3.10.3 DETERMINACIÓN DE GRASAS Y ACEITES

La muestra M4 fue dividida en 2 procedimientos Soxhlet (50 g cada una); obteniéndose así las muestras M4.7a, M4.7b, M4.15a y M4.15b. Se realizó el proceso de arrastre de grasas que es análogo al expuesto en la sección 3.7.3.2



Figura 45 Aceite obtenido tras arrastre de grasas en M1.15, M2.15 y M3.15



Figura 46 Aceite obtenido tras arrastre de grasas en M4.15a y M4.15b

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente capítulo tiene como objetivo exponer y analizar los resultados obtenidos a lo largo del desarrollo experimental de la investigación. Los datos presentados provienen de las diversas etapas de la síntesis y funcionalización del óxido de grafeno (OG), así como de las pruebas de biodegradación de hidrocarburos y crecimiento bacteriano de *Bacillus subtilis*.

Primero se abordarán los resultados de caracterización del material sintetizado. Posteriormente, se presentarán los resultados del crecimiento bacteriano en presencia de OG y OG funcionalizado, evaluando el efecto de diferentes precursores de nitrógeno sobre la actividad microbiana. Finalmente, se discutirán los resultados de las pruebas de biodegradación del aceite vehicular en medios acuosos y en suelos contaminados, analizando el impacto del OG funcionalizado y del uso de energía eléctrica en la eficiencia del proceso de electrobiorremediación.

Para facilitar la interpretación de los resultados y la discusión de los experimentos realizados, se ha establecido una nomenclatura específica que identifica las diferentes corridas de las muestras de suelo con *Bacillus subtilis*. Esta nomenclatura se basa en dos variables principales: el tiempo de incubación y la incorporación de energía eléctrica durante el proceso. (Tabla 6)

Tabla 6 Muestra de suelo + medio de cultivo que fueron caracterizadas

INCUBACIÓN	MUESTRA	ENERGÍA ELÉCTRICA
7 días	M1.7	×
	M2.7	✓
15 días	M1.15	×
	M2.15	✓

M1.7: Muestra de suelo más la bacteria incubada por 7 días sin energía eléctrica.

M2.7: Muestra de suelo más la bacteria incubada por 7 días con energía eléctrica.

M1.15: Muestra de suelo más la bacteria incubada por 15 días sin energía eléctrica.

M2.15: Muestra de suelo más la bacteria incubada por 7 días con energía eléctrica.

4.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

La microscopía electrónica de barrido se utilizó para obtener información morfológica y estructural de los materiales, con el fin de identificar las modificaciones estructurales inducidas por el proceso de funcionalización.

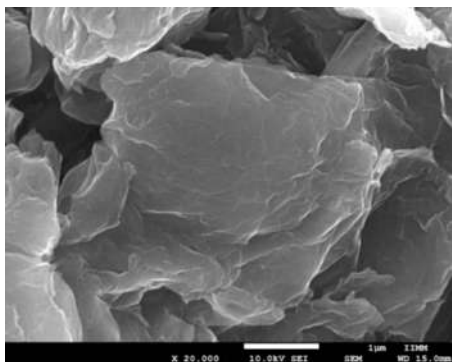


Figura 47 OG natural visto bajo MEB X30,000

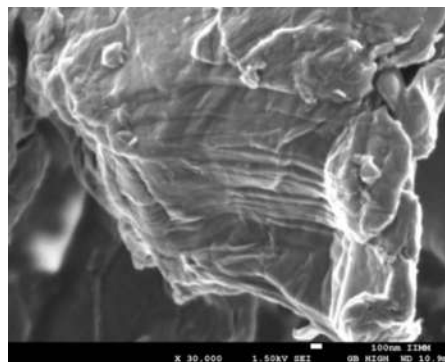


Figura 48 OG natural visto bajo MEB X50,000

Las Figuras 47 y 48 corresponden al óxido de grafeno natural, donde se puede contemplar una superficie con aglomeraciones laminares de apariencia rugosa e irregulares, las cuales están distribuidas de manera dispersa. Dichas estructuras poseen un tamaño de entre 30 ± 5 μm . Los aumentos para estas micrografías son de 20 000 y 30 000X, respectivamente. En la Figura 48 se observa una estructura vertical. La cual está conformada de diversas láminas apiladas, dando la apariencia de un hojaldre, el cual es característico de este material.

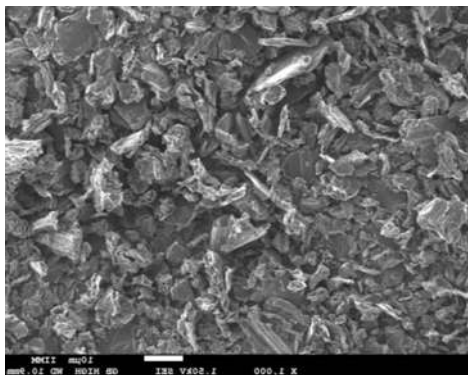


Figura 49 OG con urea visto bajo MEB X1,000

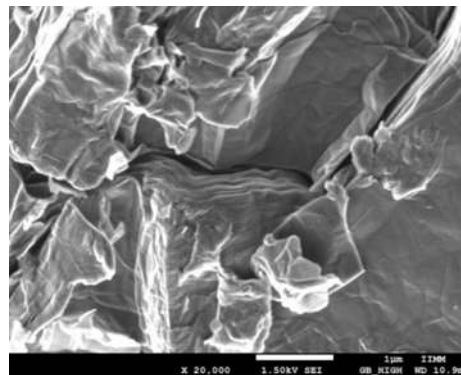


Figura 50 OG con urea visto bajo MEB X20,000

Las Figuras 49 y 50 pertenecen al óxido de grafeno impurificado con urea. En la Figura 49, obtenida a 1000X, se perciben estructuras laminares en diferentes posiciones con morfología cristalina con bordes afilados, los cuales, al observarse detenidamente a una mayor amplificación, 20000X, nos muestran la estructura laminar propia del OG, Figura 50. El tamaño de las estructuras está en el orden de 10 – 30 μm . La flecha de la Figura 50 muestra la evidencia del espaciamiento entre las láminas de grafeno; la cual es del orden de nanómetros.

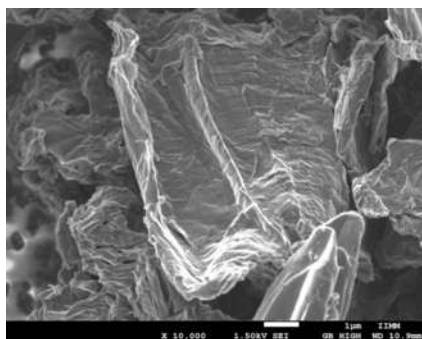


Figura 51 OG con tiourea visto bajo MEB X10,000

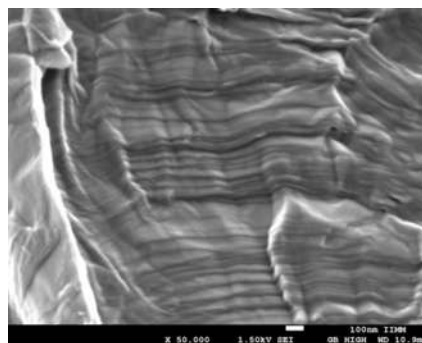


Figura 52 OG con tiourea visto bajo MEB X50,000

Las micrografías para el óxido de grafeno impurificado con tiourea se muestran en las Figuras 51 y 52. En la Figura 51 se aprecian estructuras de formas irregulares, angulares y compactas, conformadas por múltiples capas, las cuales aumentan el grosor dependiendo de la cantidad de capas que hay, a su vez se ven muchas partículas con gran índice de cristalinidad. En la Figura 52, a una magnificación de 50,000X, se puede observar una partícula en perfil, permitiendo apreciar el número de capas.

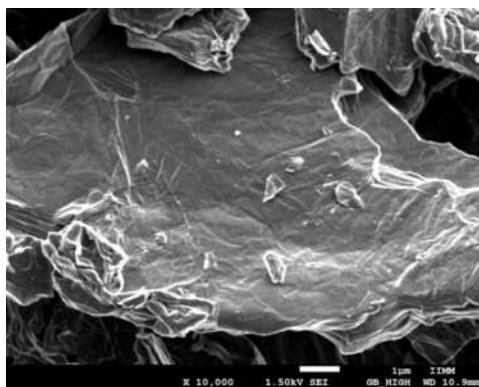


Figura 53 OG con etilendiamina visto bajo MEB 10,000X

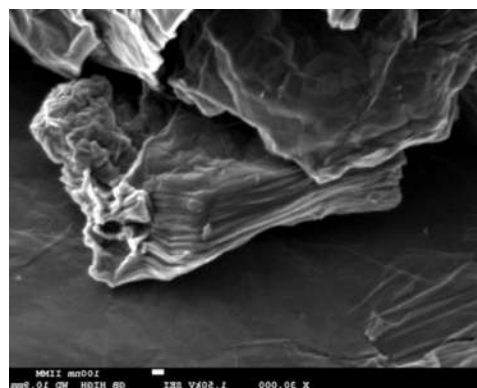


Figura 54 OG con etilendiamina visto bajo MEB 30,000X

Las imágenes del óxido de grafeno impurificado con etilendiamina se presentan en las Figuras 53 y 54. En la Figura 53 se contemplan partículas de formas irregulares con una textura en su mayoría lisa, además de algunas partículas fracturadas de mucho menor tamaño y con menor cristalinidad, que se encuentran apoyadas sobre la estructura de mayor tamaño; mientras que en la Figura 54 se observa una partícula de perfil con varias láminas completamente definidas y compactas; la distancia interlaminar está influenciada por los grupos funcionales presentes.

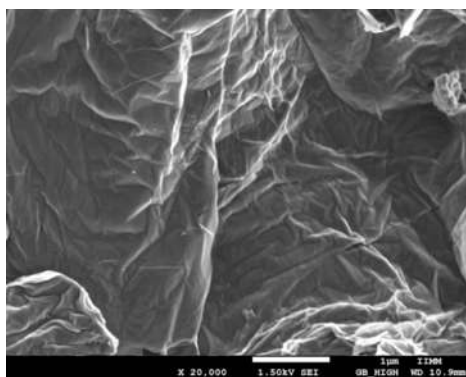


Figura 55 OG con hidrazina visto bajo MEB 20,000X

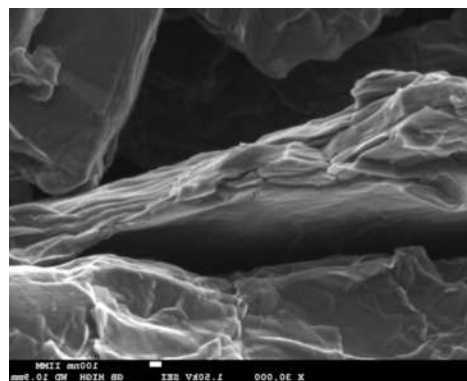


Figura 56 OG con hidrazina visto bajo MEB 30,000X

Para los compuestos de óxido de grafeno con hidrazina tenemos las micrografías de las Figuras 55 y 56. En la Figura 55 se perciben formaciones columnares compuestas por apilamientos de láminas. A pesar de las irregularidades se logran apreciar escamas de gran tamaño, las cuales resultan ser tan delgadas, que visto bajo ese aumento aparenta ser una estructura homogénea y voluminosa. La Figura 56 corresponde a una imagen amplificada de las hojuelas con gran longitud y uniformidad con un ancho promedio de $5 \pm 5 \mu\text{m}$.

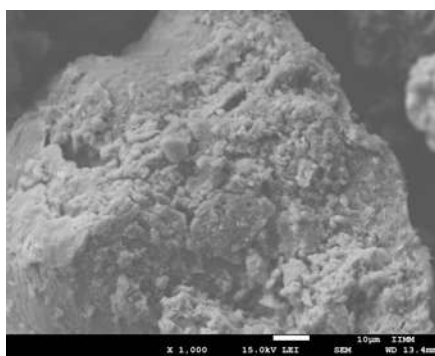


Figura 57 Suelo+MC-e incubado 7 días en MEB 1,000X

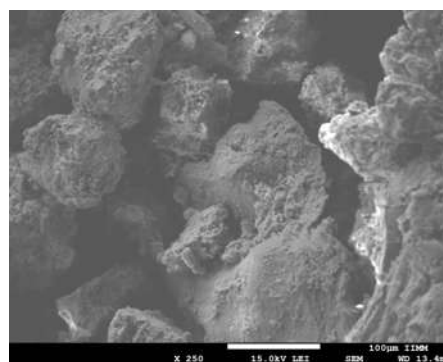


Figura 58 Suelo+MC-e incubado 7 días en MEB 250X

La caracterización morfológica de la muestra de suelo M1.7 se presenta en las Figuras 57 y 58. En la Figura 57, se observa una partícula de suelo con una superficie porosa y rugosa, marcada por depresiones de distintas profundidades y algunas grietas. La morfología general del grano es amorfa. Por otro lado, la Figura 58 muestra varios granos con baja cohesión entre sí, lo que permite distinguir claramente los límites de cada grano. Estos granos tienen tamaños que oscilan entre 5 y 10 μm .

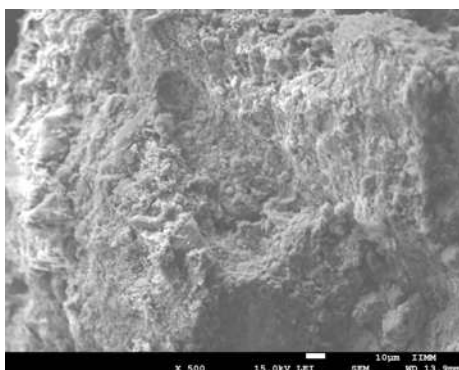


Figura 59 Suelo + MC + e incubado 7 días. MEB 500X

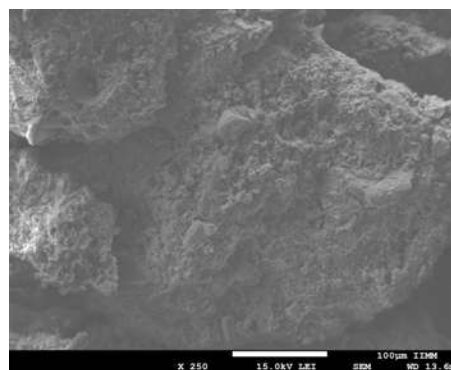


Figura 60 Suelo + MC +e incubado 7 días. MEB 250X

Las Figuras 59 y 60 ilustran la muestra asociada a M2.7. En la Figura 59, se observa una partícula de suelo con una superficie completamente irregular y rugosa, caracterizada por picos de diferentes tamaños y formas angulares, así como por agujeros de diversas profundidades y diámetros. En la Figura 60, se aprecia una estructura angular y amorfa con formaciones rocosas sobre su superficie. Aunque estas formaciones tienen baja cohesividad entre sí, la estructura en general muestra firmeza. Las superficies presentan texturas rugosas de diferentes características.

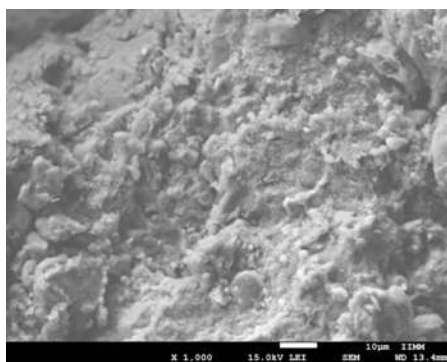


Figura 61 Suelo + MC-e incubado 15 días. MEB 1,000X

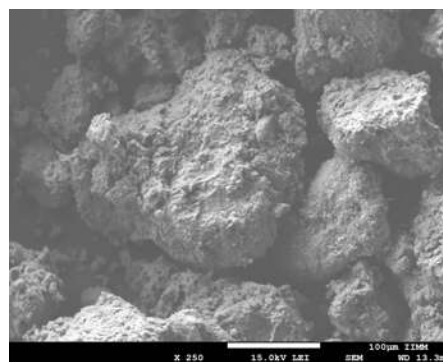


Figura 62 Suelo + MC-e incubado 15 días. MEB 250X

La morfología de la muestra M1.15 se presenta en las Figuras 61 y 62. En la Figura 61, se observa la superficie de una partícula de suelo, que muestra una textura rugosa con protuberancias de diferentes tamaños en altura y diámetro. En la Figura 62 se aprecian varias partículas de suelo, con tamaños de $10 \pm 5 \mu\text{m}$. Los espacios entre estas partículas están parcialmente rellenos por partículas más pequeñas, lo que reduce significativamente el tamaño de los huecos entre ellas.

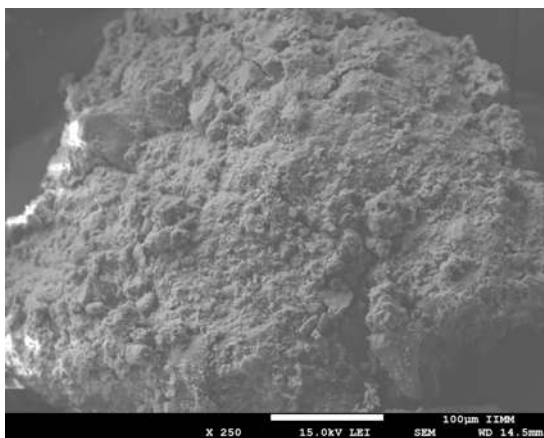


Figura 63 Suelo+MC+e incubado 15 días. MEB 250X

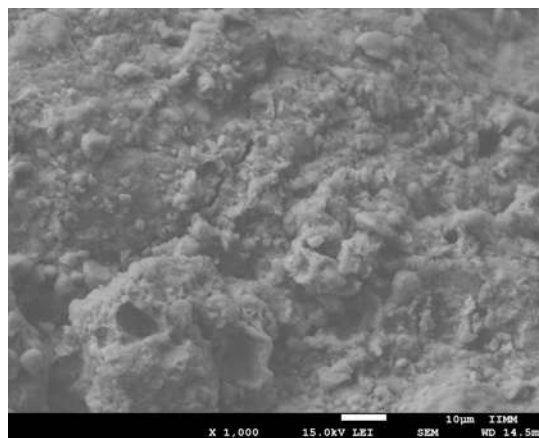


Figura 64 Suelo+MC+e incubado 15 días en MEB 1,000X

En las Figuras 63 y 64 se presentan micrografías detalladas de la muestra M2.15, revelando una superficie irregular y porosa. La estructura se caracteriza por un contraste entre zonas claras y oscuras, lo que genera una marcada sensación de relieve. Además, se observan macroporos distribuidos a lo largo de la superficie, con profundidades variables y diámetros que oscilan entre 3 y 8 μm . Estas características indican una morfología compleja, con una topografía y distribución de poros heterogéneas.

4.2 ANÁLISIS POR DISPERSIÓN DE ENERGÍA (EDS)

El análisis por dispersión de energía, acoplado al microscopio electrónico de barrido, es una técnica utilizada para identificar la composición elemental de materiales. Se basa en la detección de rayos X emitidos por una muestra cuando es excitada por un haz de electrones. Es una técnica semicuantitativa, ya que el análisis se realiza en un área delimitada de la muestra, por lo que se le da más valor al análisis cualitativo.

El espectro del óxido de grafeno obtenido con esta técnica se muestra en la Figura 65. Además, la Tabla 7 resume los porcentajes en peso de los elementos presentes en la muestra.

Tabla 7 Especificaciones del espectro EDS para el OG natural

ELEMENTO	NÚMERO ATÓMICO	PESO (%)	SEÑAL PRINCIPAL	NIVEL ENERGÉTICO
Carbono	6	62.74	0.282	K
Oxígeno	8	28.80	0.523	K
Azufre	16	8.45	2.307	K
Nitrógeno	7	0	0.392	K

El análisis por dispersión de energía para el óxido de grafeno natural (ver Figura 65) revela señales características de los elementos presentes en su estructura. Se observa una banda de alta intensidad para el carbono a 0.282 keV, con una superposición de señal atribuida al potasio; seguida por una banda de oxígeno a 0.523 keV. Finalmente, se detecta una pequeña banda correspondiente al azufre a 2.307 keV. La Tabla 7 presenta los porcentajes en peso de cada elemento encontrado en el compuesto, destacando el carbono con un 62.74%, seguido del oxígeno con 28.80% y el azufre con 8.45%.

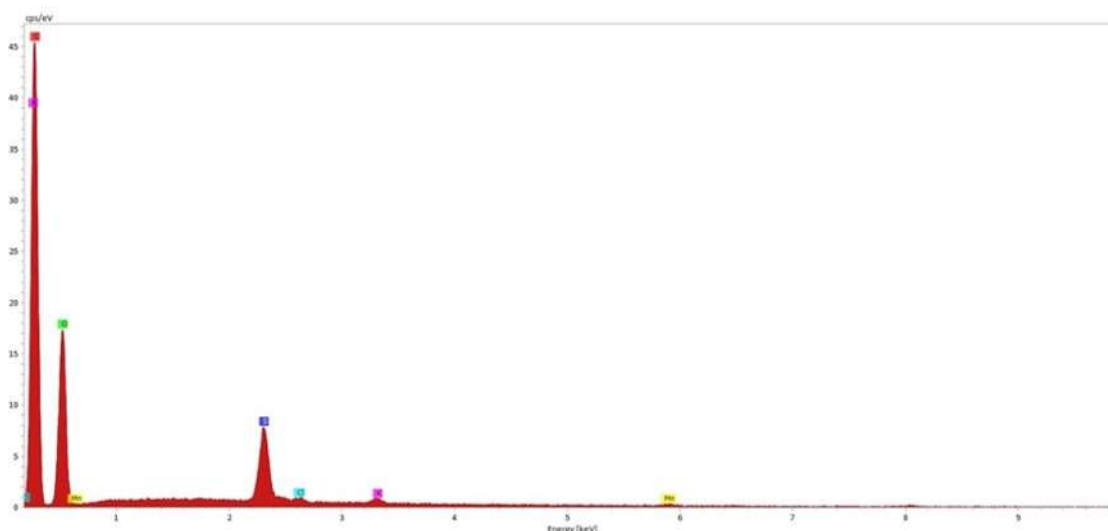


Figura 65 Análisis EDS de OG natural

Por otro lado, la Figura 66 ilustra el análisis por dispersión de energía del óxido de grafeno impurificado con urea. Este análisis revela los siguientes picos de los elementos presentes en el compuesto. La banda más pronunciada corresponde al carbono a 0.282 keV, mientras que el oxígeno muestra una señal a 0.523 keV. Además, se observa un pico apenas perceptible

de azufre a 2.307 keV. La Tabla 8 resume los porcentajes en peso de cada elemento encontrado en el compuesto.

Tabla 8 Especificaciones del espectro EDS para el OG con urea

ELEMENTO	NÚMERO ATÓMICO	PESO (%)	SEÑAL PRINCIPAL	NIVEL ENERGÉTICO
Carbono	6	88.17	0.282	K
Oxígeno	8	10.19	0.523	K
Azufre	16	1.44×10^{-4}	2.307	K
Nitrógeno	7	1.63	0.392	K

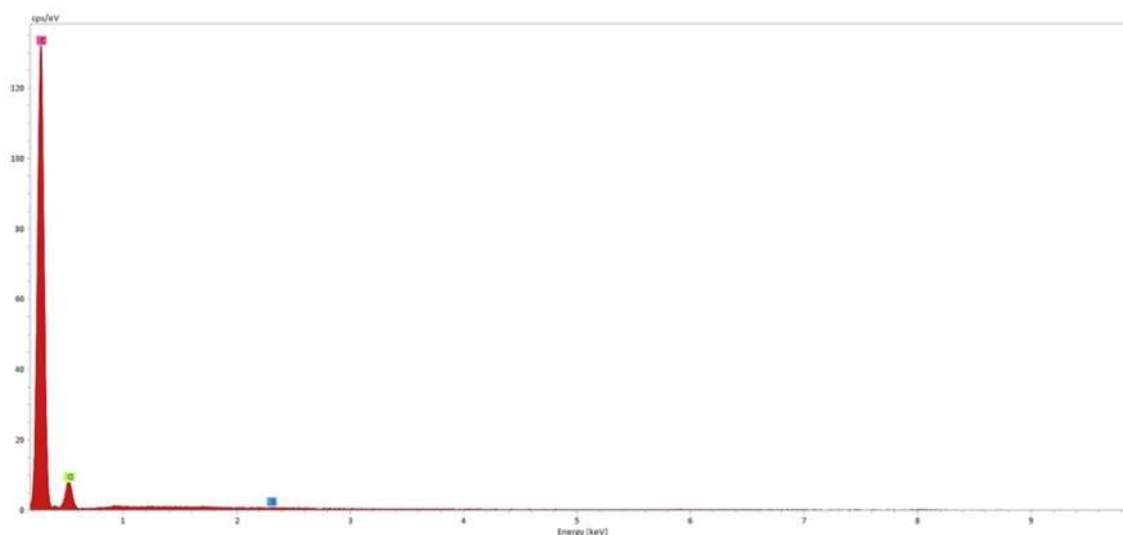


Figura 66 Análisis EDS de OG impurificado con urea

En la Figura 67 se presenta el análisis EDS del óxido de grafeno impurificado con tiourea. Las bandas representativas de los elementos en este compuesto se muestran en el espectro en el siguiente orden de intensidad: el carbono exhibe un pico prominente en 0.282 keV, seguido por el azufre con un pico en 2.307 keV, por último, el oxígeno con una banda energética en 0.523 keV. En la Tabla 9 se resumen los porcentajes en peso de cada elemento identificado en el compuesto.

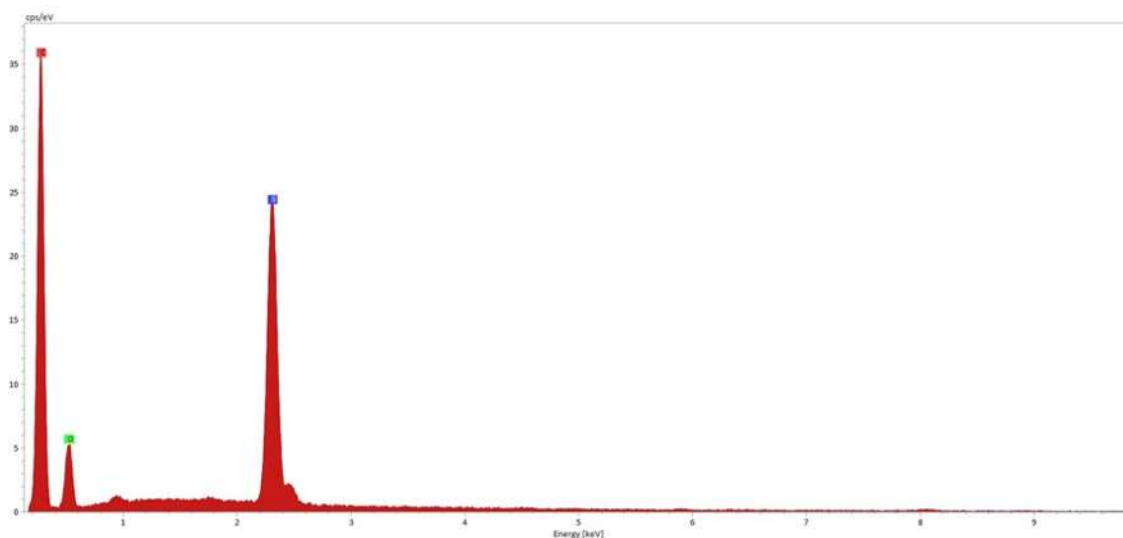


Figura 67 Análisis EDS de OG impurificado con tiourea

El análisis para la muestra de óxido de grafeno impurificado con etilendiamina se presenta en la Figura 68. En ella, se observan señales provenientes de los elementos que componen dicha muestra. El carbono muestra la banda más intensa en 0.282 keV, seguido por el oxígeno en 0.523 keV. También se detecta cobre con un pico en 0.930 keV, y manganeso con una pequeña señal en 0.637 keV, además de otra señal de menor intensidad en 5.98 keV. En la Tabla 10 se resumen los porcentajes en peso de cada elemento identificado en el compuesto.

Tabla 9 Especificaciones del espectro EDS para el OG con tiourea

ELEMENTO	NÚMERO ATÓMICO	PESO (%)	SEÑAL PRINCIPAL	NIVEL ENERGÉTICO
Carbono	6	65.85	0.282	K
Oxígeno	8	8.49	0.523	K
Azufre	16	25.52	2.307	K
Nitrógeno	7	0.15	0.392	K

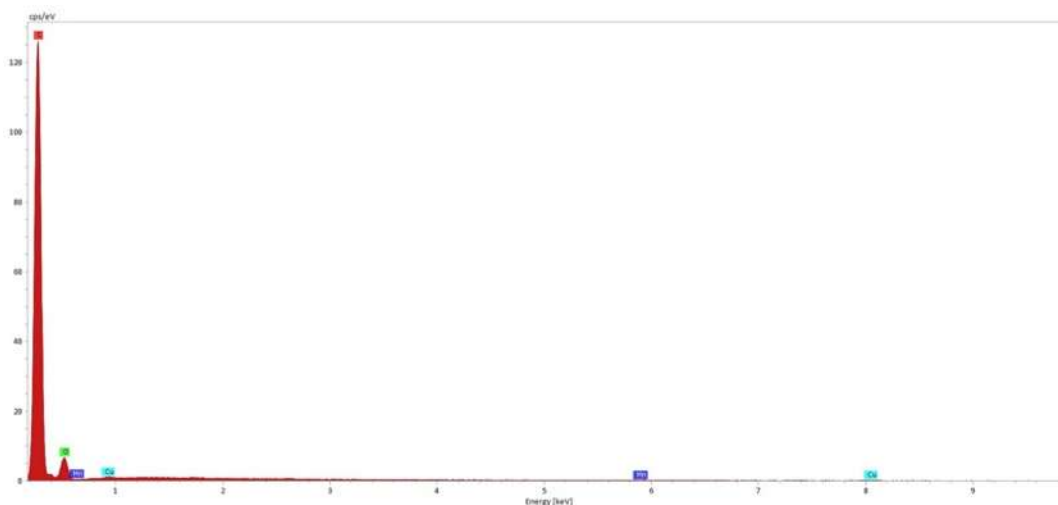


Figura 68 EDS de OG con etilendiamina

Tabla 10 Especificaciones del espectro EDS para el OG con etilendiamina.

ELEMENTO	NÚMERO ATÓMICO	PESO (%)	SEÑAL PRINCIPAL	NIVEL ENERGÉTICO
Oxígeno	8	71.36	0.523	K
Nitrógeno	7	28.63	2.307	K
Azufre	16	0	0.392	K

Para el compuesto de óxido de grafeno impurificado con hidrazina se presenta en la Figura 69. En el espectro, se observa exclusivamente la presencia de los siguientes elementos: carbono con la señal más alta en 0.282 keV, seguido por una banda de menor tamaño correspondiente al oxígeno en 0.523 keV. También se detecta nitrógeno con un pico en 0.392 keV, y una pequeña banda de azufre en 2.307 keV de baja intensidad. Por otra parte, en la Tabla 11 se muestra el porcentaje en peso de cada elemento identificado en el compuesto.

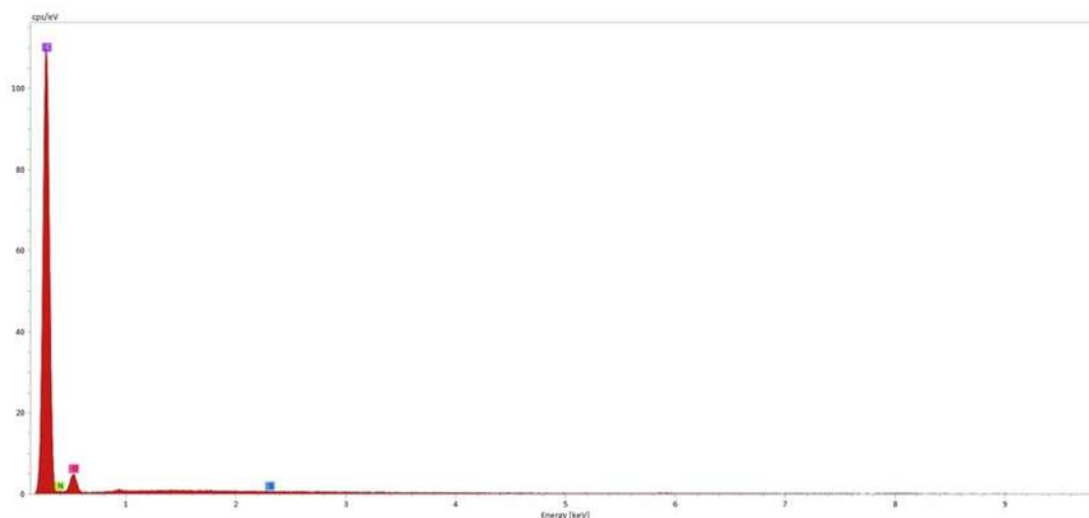


Figura 69 EDS de OG con hidrazina

Tabla 11 Especificaciones del espectro EDS para el OG con hidrazina.

ELEMENTO	NÚMERO ATÓMICO	PESO (%)	SEÑAL PRINCIPAL	NIVEL ENERGÉTICO
Carbono	6	90.81	0.282	K
Oxígeno	8	7.74	0.523	K
Azufre	16	0	2.307	K
Nitrógeno	7	1.45	0.392	K

El espectro para la muestra de suelo M1.7 se presenta en la Figura 70, destacando las siguientes bandas de absorción: el oxígeno, con la banda de mayor intensidad en 0.523 keV; el silicio, con una señal en 1.740 keV; y el cobre, que se observa con un pico en 0.930 keV, así como otro menos pronunciado en 8.049 keV, atribuible al proceso de metalización realizado previamente en la muestra para la observación de las micrografías. Además, se detecta la presencia de aluminio con un valor de 1.487 keV.

En la Tabla 12, se presentan los elementos comunes en suelos arcillosos. El oxígeno aparece en la proporción más alta, lo cual es característico de suelos con alta permeabilidad y aireación. Desde un punto de vista físico, esto permite que el agua se mueva con facilidad a través de las partículas del suelo.

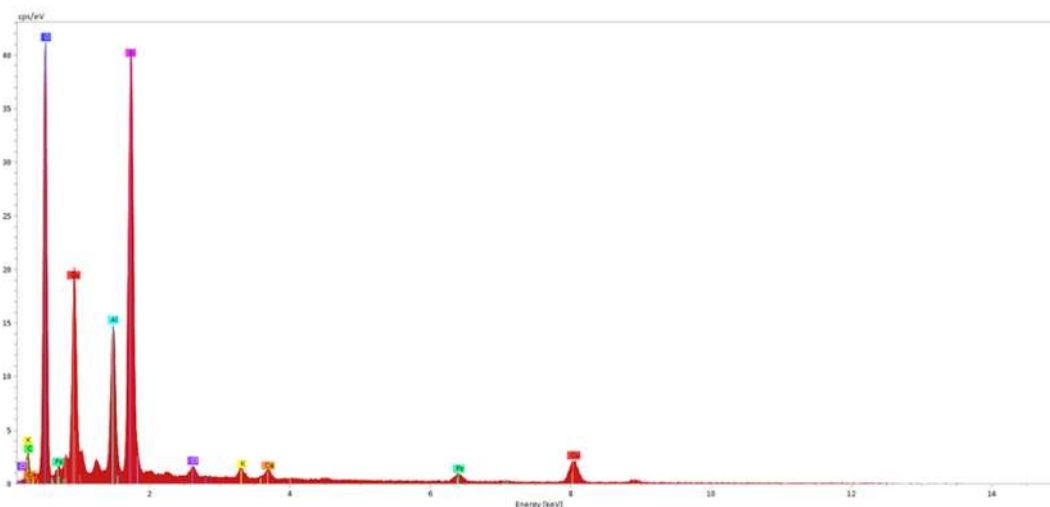


Figura 70 EDS suelo + MC - e incubado 7 días

Tabla 12 Especificaciones del espectro EDS para la muestra M1.7

ELEMENTO	NÚMERO ATÓMICO	PESO (%)	SEÑAL PRINCIPAL	NIVEL ENERGÉTICO
Oxígeno	8	56.09	0.523	K
Silicio	14	4.96	1.740	K
Cloro	17	5.65	2.622	K
Potasio	19	6.73	3.313	K
Calcio	20	8.72	3.691	K
Hierro	26	17.83	6.403	K

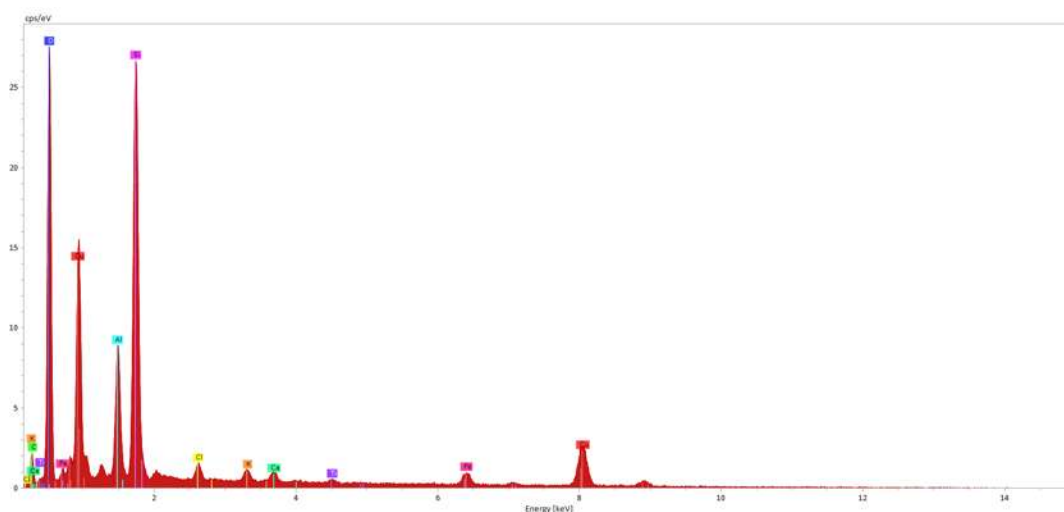


Figura 71 EDS de suelo + MC + e incubado por 7 días

En la Figura 71, se presenta el análisis realizado a la muestra M2.7, donde se observa la presencia de oxígeno con la banda de mayor intensidad de todo el espectro, ubicada en 0.523 keV. El silicio muestra una banda de absorción en 1.740 keV, mientras que el cobre presenta dos señales: una de mayor intensidad en 0.930 keV y otra en 8.049 keV. Como se mencionó anteriormente, la presencia de cobre se debe al proceso de metalización realizado en la muestra antes del análisis. Asimismo, el aluminio se detecta en 1.487 keV. En la Tabla 13 se presentan resultados de los porcentajes en peso de los elementos que se detectaron en el análisis EDS, los cuales son comunes en suelos arcillosos.

Tabla 13 Especificaciones del espectro EDS para la muestra M2.7

ELEMENTO	NÚMERO ATÓMICO	PESO (%)	SEÑAL PRINCIPAL	NIVEL ENERGÉTICO
Oxígeno	8	45.06	0.523	K
Silicio	14	38.19	1.740	K
Cloro	17	2.66	2.622	K
Potasio	19	2.41	3.313	K
Calcio	20	2.37	3.691	K
Titanio	22	1.23	4.510	K
Hierro	26	8.07	6.403	K

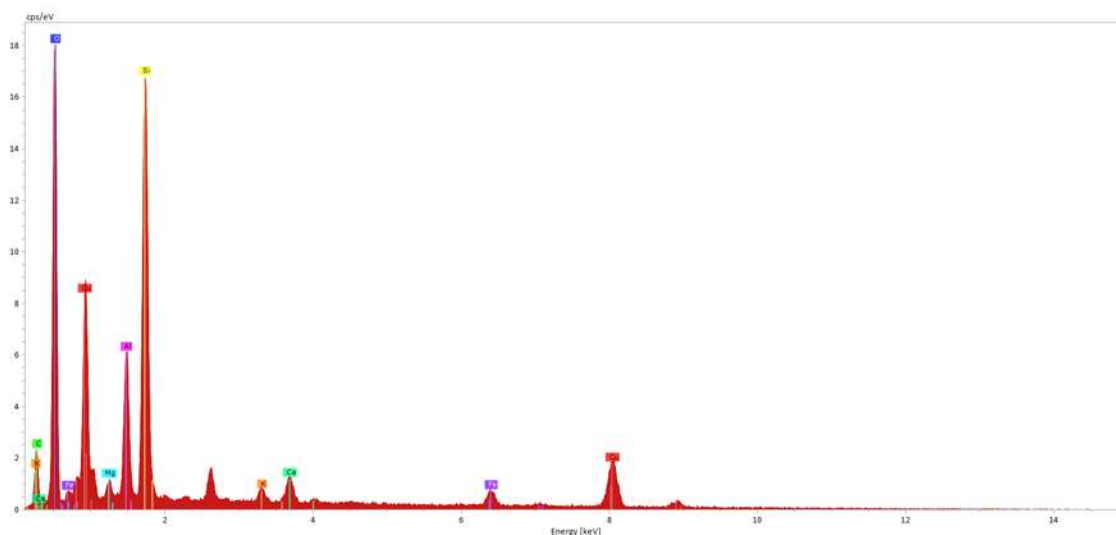


Figura 72 EDS de suelo + MC – e incubado por 15 días

Para la muestra de suelo M1.15, se obtuvo el espectro presentado en la Figura 72. Al igual que en los análisis anteriores, se identifican los mismos elementos. La banda característica del oxígeno se observa claramente en 0.523 keV. El silicio presenta una señal en 1.740 keV. El cobre muestra dos señales distintivas en 0.930 y 8.049 keV. Además, se detecta una banda de absorción en 1.487 keV, correspondiente al aluminio. En la Tabla 14, se proporciona un resumen de los porcentajes en peso y los niveles de absorción de energía para los elementos detectados en la muestra.

Tabla 14 Especificaciones del espectro EDS para la muestra M1.15

ELEMENTO	NÚMERO ATÓMICO	PESO (%)	SEÑAL PRINCIPAL	NIVEL ENERGÉTICO
Carbono	6	7.80	0.282	K
Oxígeno	8	41.87	0.523	K
Magnesio	12	1.22	1.254	K
Silicio	14	30.93	1.740	K
Azufre	16	0.61	2.307	K
Cloro	17	4.11	2.622	K
Potasio	19	2.12	3.313	K
Calcio	20	4.61	3.691	K
Hierro	26	6.72	6.403	K

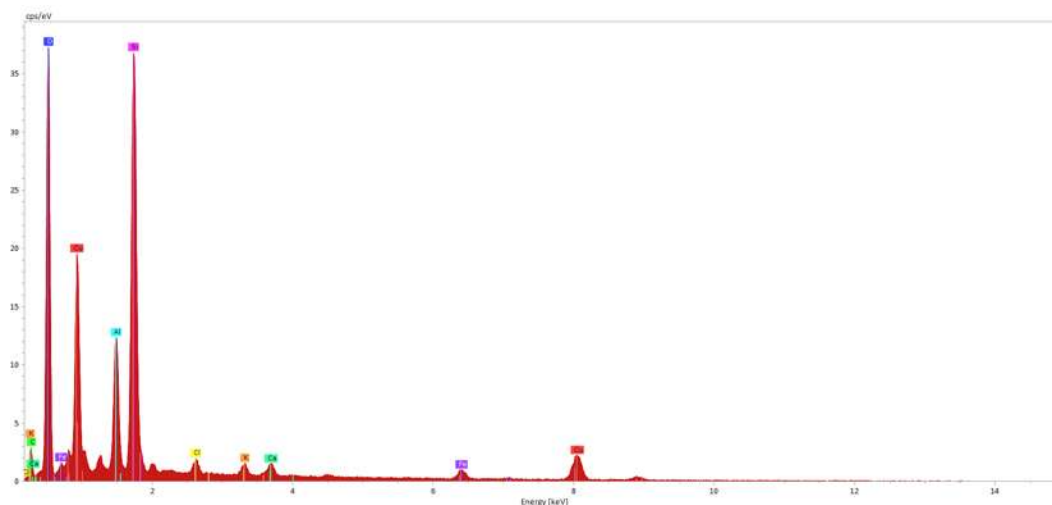


Figura 73 EDS de suelo + MC + e incubado por 15 días

El análisis de la muestra de suelo M2.15 se muestra en la Figura 73. En el espectro, se identifican las señales de los elementos listados a continuación. La señal del oxígeno aparece en 0.523 keV, mientras que el silicio presenta su señal característica en 1.740 keV. El aluminio muestra un pico en 1.487 keV. En cuanto al cobre, se observan dos bandas: una de mayor intensidad en 0.930 keV y otra de menor intensidad en 8.049 keV. Los resultados de los porcentajes en peso se resumen en la Tabla 15

Tabla 15 Porcentaje de peso de cada elemento en M2.15

ELEMENTO	NÚMERO ATÓMICO	PESO (%)	SEÑAL PRINCIPAL	NIVEL ENERGÉTICO
Oxígeno	8	46.87	0.523	K
Silicio	14	37.32	1.740	K
Cloro	17	2.11	2.622	K
Potasio	19	2.42	3.313	K
Calcio	20	3.22	3.691	K
Titanio	22	0.76	4.510	K
Hierro	26	7.27	6.403	K

4.3 ESPECTROCOPIA FOTOELECTRÓNICA DE RAYOS X (XPS)

La espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS) es una técnica superficial que permite identificar la composición elemental y los estados de oxidación de los elementos presentes en una muestra. En este estudio, se utilizó para caracterizar el óxido de grafeno funcionalizado, evaluando la presencia de elementos propios del óxido de grafeno y los elementos impurificantes. Esta técnica es fundamental para confirmar la incorporación de elementos dopantes en la estructura del grafeno.

En las Figuras 74 - 78 se muestran los espectros XPS generales correspondientes al compuesto OG impurificado con diferentes precursores de nitrógeno. En el análisis correspondiente al OG sin impurificar, Figura 74, es posible observar dos señales atribuidas a C1s y O1s de aproximadamente 1.26%, expresado en porcentaje atómico, así como una pequeña señal de azufre atribuida a residuos de la síntesis de OG. Las Figuras 75, 76, 77 y 78 muestran los espectros XPS relacionados con los compuestos OG impurificados con nitrógeno, como hidrazina, urea, tiourea, etilendiamina. En cada muestra se observa una señal

evidente que corresponde al nitrógeno. Además, en el compuesto OG impurificado con tiourea, se observa un aumento en el contenido de S que proviene del mismo compuesto. En la Tabla 16 se resume el contenido atómico elemental de N, C, O y S. Posteriormente al análisis mediante XPS del compuesto OG, se aplicó un procedimiento de deconvolución a los compuestos que contienen nitrógeno. Se observó que los valores de intensidad de la señal C1s para las diferentes muestras disminuye; así como para la señal C-O, situada en 286.8 eV. Cercana a esta señal se encontró el valor de la energía de la unión del C-N en 287.7 eV, evidenciando la presencia de nitrógeno en las diferentes muestras. Estos resultados concuerdan con los valores informados anteriormente en reportes previos de otros autores. (Cedeño et al., 2017; Rangel et al., 2022; Wu et al., 2016)

- ÓXIDO DE GRAFENO NATURAL

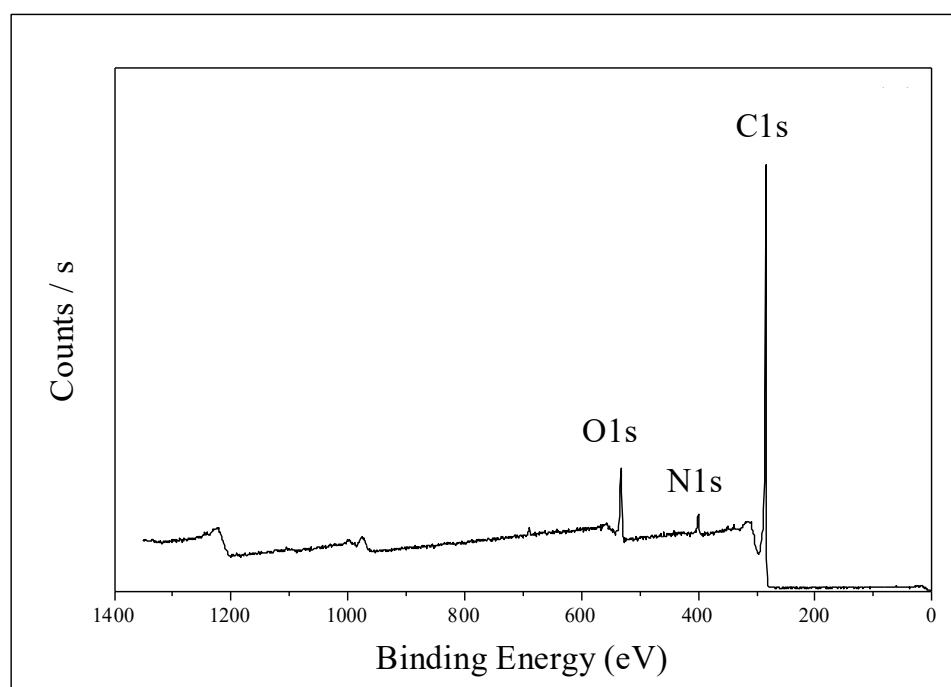


Figura 74 Espectro general XPS del óxido de grafeno (OG).

- ÓXIDO DE GRAFENO IMPURIFICADO CON HIDRAZINA

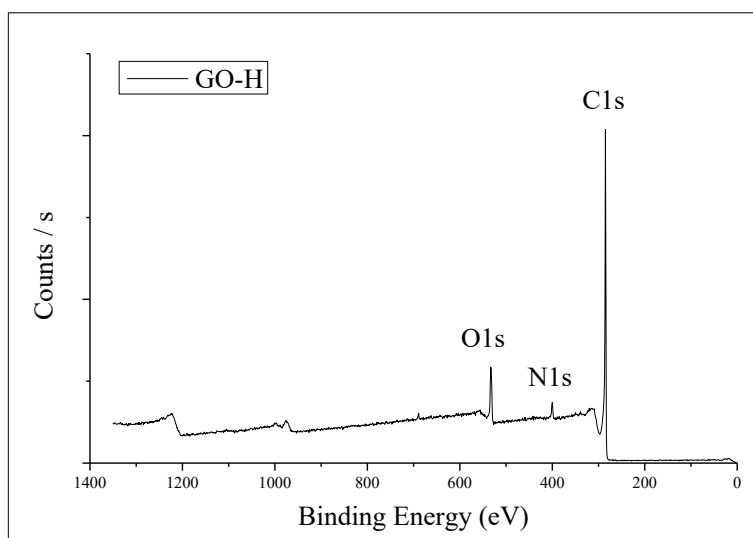


Figura 75 Espectro general XPS del sistema OG-hidrazina.

- ÓXIDO DE GRAFENO IMPURIFICADO CON UREA

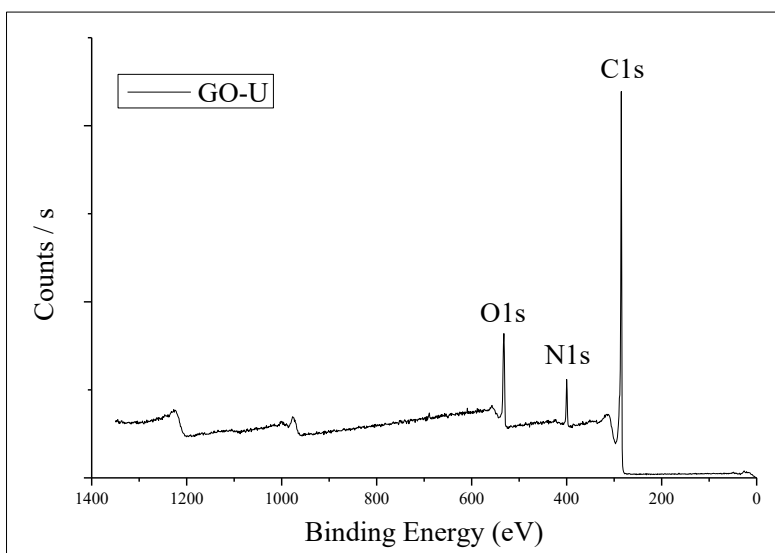


Figura 76 Espectro general XPS del sistema OG-urea.

- ÓXIDO DE GRAFENO IMPURIFICADO CON TIOUREA

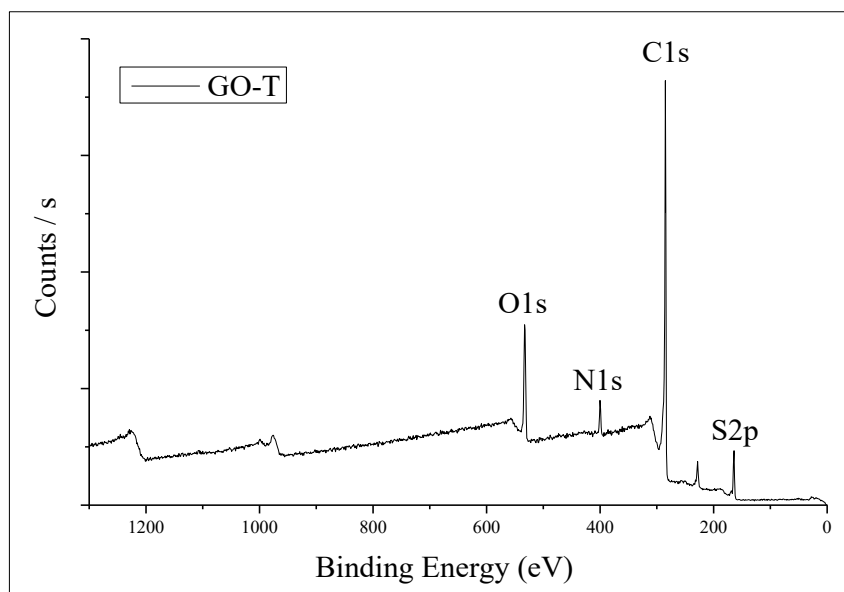


Figura 77 Espectro general XPS del sistema OG-tiourea.

- ÓXIDO DE GRAFENO IMPURIFICADO CON ETILENDIAMINA

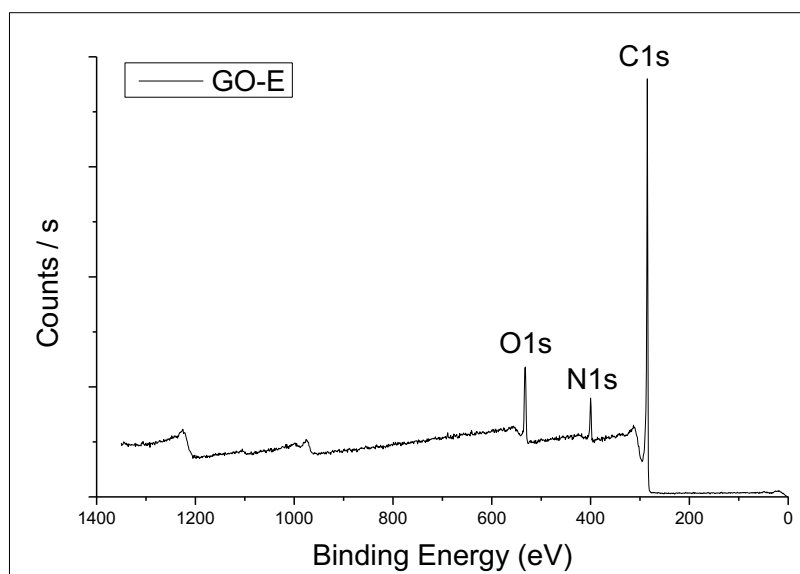


Figura 78 Espectro general XPS del sistema OG-etilendiamina.

Tabla 16 Porcentaje atómico de C, O y S de las muestras de OG-N⁺

MUESTRA	N	C	O	S
OG	-	83.34	15.4	1.26
OG-U	6.96	80.08	12.96	0
OG-T	4.33	77.69	13.19	4.79
OG-E	6.05	84.26	9.69	0
OG-H	3.51	86.46	10.03	0

4.4 CRECIMIENTO BACTERIANO CON ÓXIDO DE GRAFENO

En este apartado se analiza cómo el óxido de grafeno influye en la proliferación de *Bacillus subtilis* durante el proceso de biodegradación de hidrocarburos. Se presentan los resultados experimentales que demuestran la interacción entre las bacterias y el material, así como su impacto en la tasa de crecimiento bajo diferentes condiciones. Este análisis permite evaluar la eficacia del óxido de grafeno como agente promotor del crecimiento bacteriano, destacando sus beneficios potenciales en aplicaciones de biorremediación.

4.4.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO

Esta cinética se llevó a cabo para determinar con que OG incrementa la reproducción bacteriana. Se llevó a cabo durante 48 horas; donde se realizaron 10 lecturas, las cuales fueron tomadas en las horas 1, 2, 4, 8, 12, 24, 27, 30 y 48 después de que se sembró el inóculo en los distintos matraces. Donde se pudieron obtener los siguientes resultados.

- MEDIO DE CULTIVO NUTRITIVO + BACTERIA (BLANCO)

Tabla 17 Resultado de absorbancia en medio de cultivo inoculado con *B. subtilis* (blanco)

LECTURA	HORAS TRANSCURRIDAS	ABS M1	ABS M2	PROMEDIO
1	1	0.410	0.410	0.410
2	2	0.033	0.253	0.140
3	4	0.038	0.039	0.039
4	8	0.044	0.044	0.044
5	10	0.091	0.090	0.091
6	12	0.298	0.120	0.209
7	24	0.332	0.388	0.360
8	27	0.446	0.393	0.420
9	30	0.473	0.480	0.476
10	48	0.153	0.168	0.161

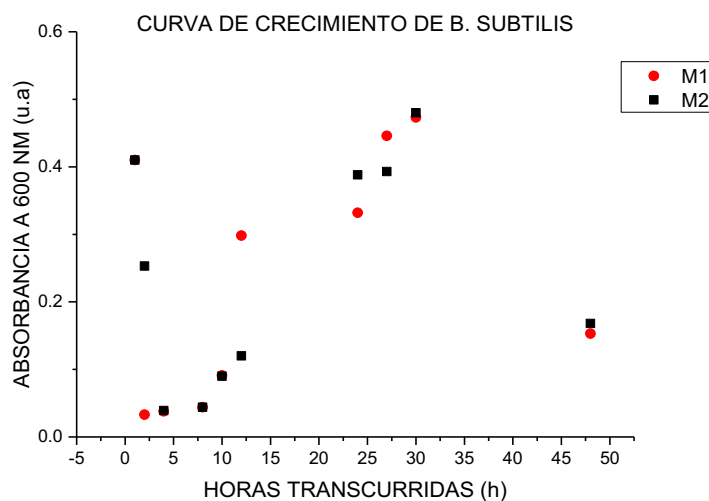


Figura 79 Gráfica de crecimiento bacteriano en medio de cultivo nutritivo (blanco)

La Tabla 17 muestra los valores promedio de absorbancia durante el crecimiento de *Bacillus subtilis* en un medio nutritivo. La densidad óptica (DO) inicial es alta (0.410 U.A a 1 hora), pero disminuye notablemente a 0.140 U.A a las 2 horas, sugiriendo un ajuste al medio. A partir de las 4 horas, la DO comienza a aumentar, alcanzando su pico a las 30 horas (0.476

U.A), lo que indica un crecimiento exponencial. A las 48 horas, la DO cae a 0.161 U.A, indicando que las bacterias podrían haber alcanzado la fase estacionaria o de declive. La Figura 79 muestra un crecimiento constante hasta las 30 horas, seguido de una reducción, posiblemente por la limitación de nutrientes.

- ÓXIDO DE GRAFENO NATURAL

Tabla 18 Resultados de absorbancia en óxido de grafeno natural

LECTURA	HORAS TRANSCURRIDAS	ABS M1	ABS M2	PROMEDIO
1	1	0.465	0.466	0.465
2	2	0.427	0.419	0.423
3	4	0.495	0.469	0.482
4	8	0.468	0.488	0.478
5	10	0.570	0.560	0.565
6	12	0.470	0.577	0.523
7	24	0.868	0.845	0.856
8	27	0.861	0.877	0.869
9	30	0.914	1.057	0.985
10	48	1.187	1.050	1.118

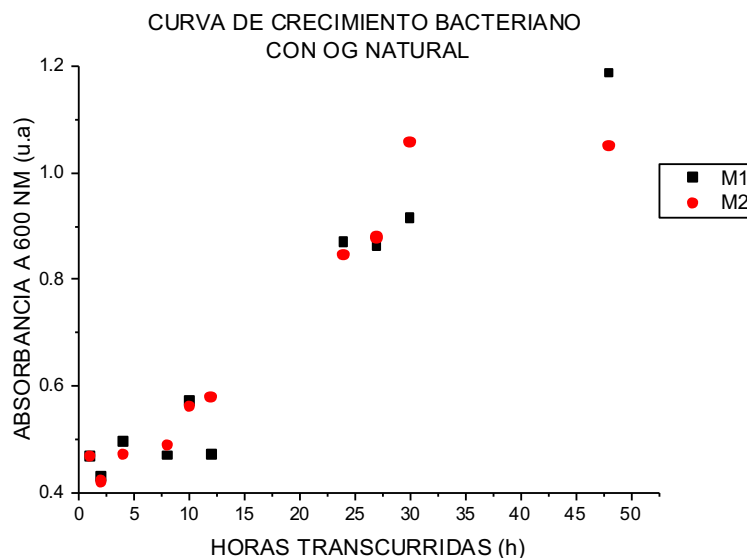


Figura 80 Gráfica de crecimiento bacteriano en óxido de grafeno natural

La Tabla 18 presenta los valores promedio de absorbancia durante un experimento de crecimiento bacteriano en presencia de óxido de grafeno natural, evaluando la densidad óptica (DO) durante 48 horas. Inicialmente, la DO es de 0.4655 U.A a la 1 hora, lo que indica un buen inicio de actividad bacteriana. Aunque hay una leve disminución a 0.423 U.A a las 2 horas, la DO aumenta progresivamente, alcanzando 0.565 U.A a las 10 horas. En la Figura 80 se muestra el crecimiento se vuelve más significativo a las 24 horas con una DO de 0.8565 U.A, llegando a un máximo de 1.1185 U.A a las 48 horas. La Figura 80 muestra un aumento constante en la DO, sugiriendo que el óxido de grafeno favorece o incluso estimula el crecimiento bacteriano de manera sostenida.

- ÓXIDO DE GRAFENO IMPURIFICADO CON UREA

Tabla 19 Resultados de absorbancia en óxido de grafeno impurificado con urea

LECTURA	HORAS TRANSCURRIDAS	ABS M1	ABS M2	PROMEDIO
1	1	0.359	0.353	0.356
2	2	0.487	0.662	0.574
3	4	0.415	0.348	0.381
4	8	0.347	0.316	0.331
5	10	0.364	0.353	0.358
6	12	0.407	0.409	0.408
7	24	0.622	0.798	0.710
8	27	0.653	0.705	0.679
9	30	0.662	0.589	0.625
10	48	0.522	0.457	0.489

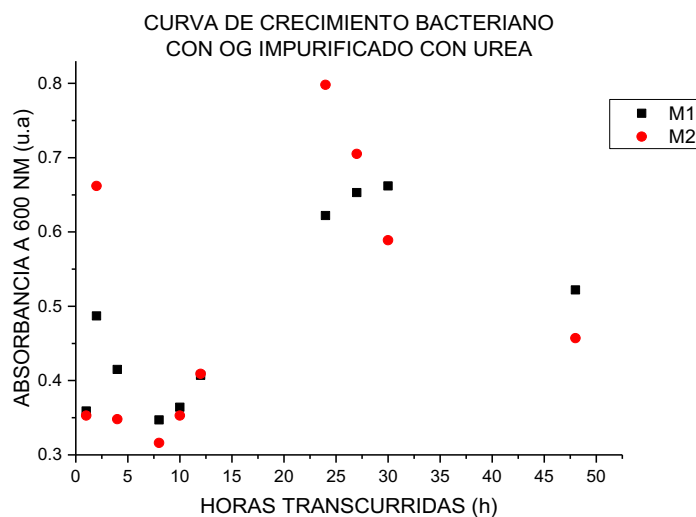


Figura 81 Gráfica de crecimiento bacteriano en óxido de grafeno impurificado con urea

Los resultados de densidad óptica (DO) registrados durante las 48 horas en un medio de cultivo nutritivo con óxido de grafeno impurificado con urea son expuestos en la Tabla 19.

Inicialmente, la DO es de 0.356 U.A a la 1 hora, reflejando una actividad bacteriana moderada. A las 2 horas, la DO aumenta rápidamente a 0.5745 U.A, pero luego disminuye a 0.3815 U.A a las 4 horas, seguido de más descensos a las 8 y 10 horas. A partir de las 12 horas, la DO se recupera, alcanzando 0.71 U.A a las 24 horas.

El crecimiento se estabiliza en las mediciones de 27 y 30 horas (0.679 y 0.6255 U.A). Sin embargo, a las 48 horas, la DO disminuye a 0.4895 U.A, sugiriendo posibles limitaciones en el medio. La Figura 81 muestra un patrón de crecimiento con fases de ajuste y estabilización, destacando la capacidad de adaptación de las bacterias en este medio, aunque con fluctuaciones en su crecimiento.

- ÓXIDO DE GRAFENO IMPURIFICADO CON TIOUREA

Tabla 20 Resultados de absorbancia en óxido de grafeno impurificado con tiourea

LECTURA	HORAS TRANSCURRIDAS	ABS M1	ABS M2	PROMEDIO
1	1	0.596	0.589	0.592
2	2	0.548	0.332	0.440
3	4	0.552	0.725	0.638
4	8	0.719	0.517	0.618
5	10	0.591	0.615	0.603
6	12	0.685	0.638	0.661
7	24	1.211	1.314	1.262
8	27	1.092	1.048	1.070
9	30	0.974	0.925	0.949
10	48	0.613	0.597	0.605

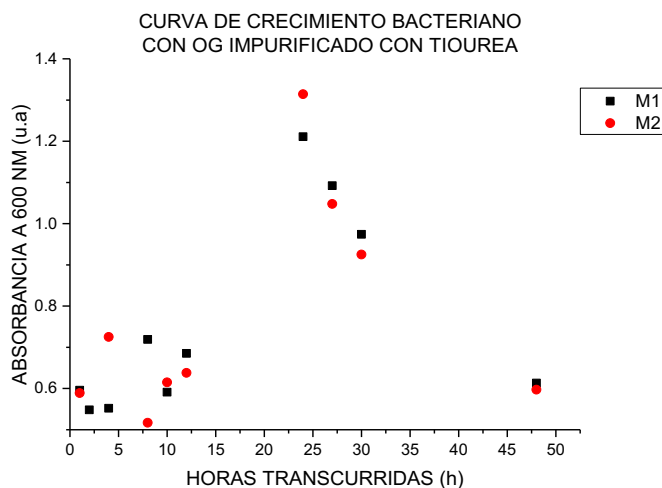


Figura 82 Gráfica de crecimiento bacteriano en óxido de grafeno impurificado con tiourea

Los valores de de DO promedio obtenidos durante el experimento de crecimiento bacteriano en el medio de cultivo nutritivo con OG impurificado con etilendiamina son mostrados en la Tabla 20. En la primera hora, la DO fue de 0.4295 U.A, indicando un inicio moderado de actividad bacteriana. A las 2 horas, la DO aumentó a 0.5735 U.A, señalando un crecimiento inicial. Sin embargo, entre las 4 y 8 horas, la DO disminuyó ligeramente, lo que sugiere fluctuaciones en el crecimiento. La tendencia mostró una recuperación a las 12 horas con una DO de 0.614 U.A, manteniéndose estable en 0.674 U.A a las 24 horas. Aunque hubo una caída a 0.48 U.A a las 27 horas, el crecimiento se intensificó nuevamente, alcanzando un máximo de 0.9985 U.A a las 48 horas. La Figura 82 muestra estas variaciones de manera clara, destacando el comportamiento dinámico del crecimiento bacteriano a lo largo del tiempo.

- ÓXIDO DE GRAFENO IMPURIFICADO CON ETILENDIAMINA

Tabla 21 Resultados de absorbancia en óxido de grafeno impurificado con etilendiamina

LECTURA	HORAS TRANSCURRIDAS	ABS M1	ABS M2	PROMEDIO
1	1	0.434	0.425	0.429
2	2	0.591	0.556	0.573
3	4	0.439	0.384	0.411
4	8	0.462	0.394	0.428
5	10	0.458	0.470	0.464
6	12	0.691	0.537	0.614
7	24	0.665	0.683	0.674
8	27	0.683	0.277	0.480
9	30	0.701	0.665	0.683
10	48	0.849	1.148	0.998

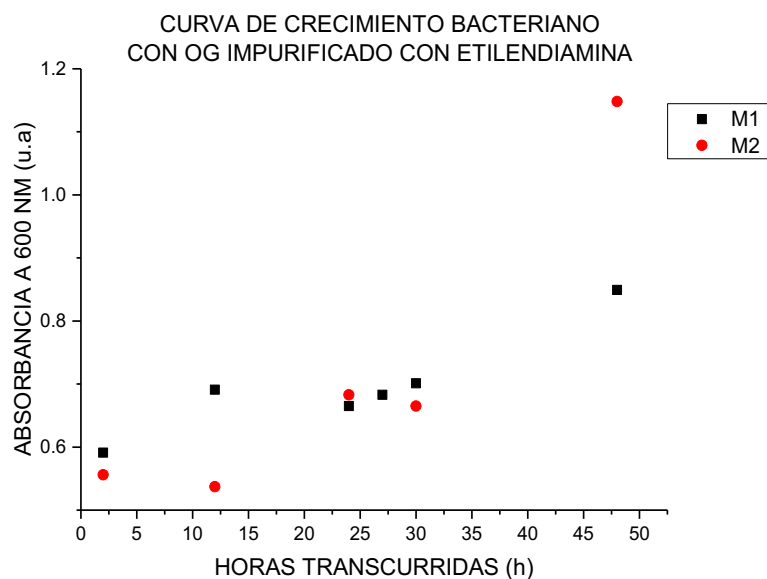


Figura 83 Gráfica de crecimiento bacteriano en óxido de grafeno impurificado con etilendiamina

Los datos de absorbancia (ABS) son presentados en la Tabla 21, la cual muestra un incremento inicial en la actividad bacteriana, con un valor promedio que aumenta de 0.4295

U.A a 0.5735 U.A en las primeras 2 horas. Posteriormente, se observa una estabilización en las mediciones de 4 a 10 horas. A partir de las 12 horas, el crecimiento bacteriano se acelera, alcanzando su máximo de 0.9985 U.A a las 48 horas. La Figura 83 evidencia este patrón, destacando un crecimiento sostenido y significativo hacia el final del experimento.

- ÓXIDO DE GRAFENO IMPURIFICADO CON HIDRAZINA

Tabla 22 Resultados de absorbancia en óxido de grafeno impurificado con hidrazina

LECTURA	HORAS TRANSCURRIDAS	ABS M1	ABS M2	PROMEDIO
1	1	0.561	0.538	0.549
2	2	0.442	0.400	0.421
3	4	0.567	0.544	0.555
4	8	0.542	0.546	0.544
5	10	0.556	0.534	0.545
6	12	0.608	0.569	0.588
7	24	0.885	0.921	0.903
8	27	0.844	0.024	0.434
9	30	0.725	0.795	0.760
10	48	0.954	1.013	0.983

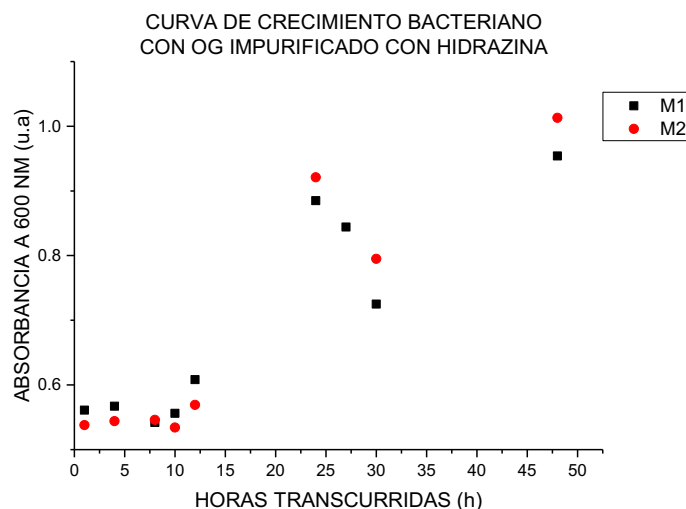


Figura 84 Gráfica de crecimiento bacteriano en óxido de grafeno impurificado con hidrazina

Se realizaron mediciones de densidad óptica (DO) durante 48 horas para evaluar el crecimiento bacteriano en un medio específico, las cuales son mostradas en la Tabla 22. En la primera hora, se registró una DO de 0.5495 U.A, indicando un inicio estable de actividad bacteriana. A las 2 horas, la DO disminuyó a 0.421 U.A, pero a partir de las 4 horas, comenzó a incrementarse nuevamente, alcanzando 0.5555 U.A. A las 12 horas, la DO llegó a 0.5885 U.A, mostrando un crecimiento sostenido. En la lectura de 24 horas, la DO aumentó considerablemente a 0.903 U.A, marcando el punto máximo de la fase logarítmica. Aunque hubo una caída notable a 0.434 U.A a las 27 horas, el crecimiento se recuperó, alcanzando 0.9835 U.A a las 48 horas.

La Figura 84 resalta estas fluctuaciones, mostrando un patrón de crecimiento con fases de estabilización, caída y recuperación, destacando el comportamiento dinámico del crecimiento bacteriano en el medio evaluado.

- RESULTADOS ESTADÍSTICOS

Se promediaron las repeticiones realizadas de cada variable y se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 23 Resultados de absorbancia de cada variable promediada

LECTURA	HORAS TRANS-CURRIDAS	BLANCO	NATURAL	UREA	TIOUREA	ETILEN-DIAMINA	HIDRAZINA
1	1	0.410	0.465	0.356	0.549	0.429	0.592
2	2	0.143	0.423	0.574	0.421	0.573	0.440
3	4	0.038	0.482	0.381	0.555	0.411	0.638
4	8	0.044	0.478	0.331	0.544	0.428	0.618
5	10	0.090	0.565	0.358	0.545	0.464	0.603
6	12	0.209	0.523	0.408	0.588	0.614	0.661
7	24	0.360	0.856	0.710	0.903	0.674	1.262
8	27	0.419	0.869	0.679	0.434	0.480	1.070
9	30	0.476	0.985	0.625	0.760	0.683	0.949
10	48	0.160	1.1185	0.489	0.983	0.998	0.605

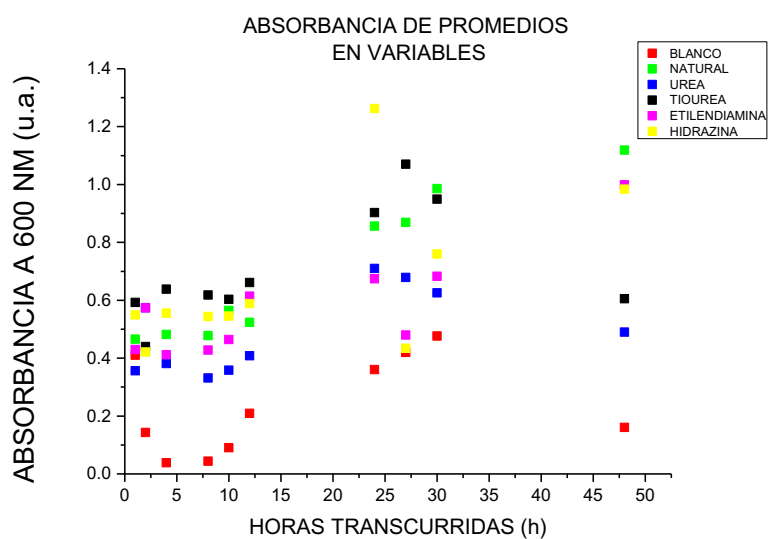


Figura 85 Grafica de crecimiento bacteriano de cada variable promediada

En la Tabla 23 se muestra el promedio de resultados de absorbancia de cada variable. Los valores indican la densidad óptica (DO) medida como función del tiempo para evaluar el crecimiento bacteriano bajo diferentes tratamientos.

En la lectura 1 (1 hora) las bacterias en el medio que contiene OG impurificado con hidrazina muestran mayor crecimiento inicial (0.5925 U.A), en contraste el medio con OG impurificado con urea tiene el crecimiento más bajo. En la lectura 7 (24 h) se observa que las bacterias en el medio que contiene OG impurificado con hidrazina se mantiene; resultando ser el medio con mayor crecimiento (1.2625 U.A). Se aprecia que el medio blanco muestra un crecimiento significativo (0.36 U.A). Finalmente, en la última lectura después de 48h, el crecimiento más alto se observa en el medio natural, y el blanco muestra una reducción en el crecimiento.

La Figura 85 sugiere que las bacterias responden de manera diferente a cada tratamiento a lo largo del tiempo. El medio de cultivo que contiene OG impurificado con hidrazina muestra consistentemente un alto crecimiento bacteriano durante las primeras 24 h, mientras que el crecimiento en el medio con urea y otras condiciones presenta variaciones. El crecimiento en el blanco aumenta inicialmente, pero no alcanza los niveles observados en algunos de los medios tratados.

4.4.2 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE BACTERIAS EN CÁMARA DE NEUBAUER

La determinación del número de bacterias en cámara de Neubauer se llevó a cabo con las 10 lecturas de cada muestra tomada para la generación de la curva de crecimiento bacteriano. Estas siempre se mantuvieron en congelación. Para esta determinación se utilizó la metodología para determinar el número de bacterias en cámara de Neubauer.

Tabla 24 Resultados de conteo en cámara de Neubauer

TIEMPO (h)	BLANCO	OG NATURAL	UREA	TIOUREA	ETILEN-DIAMINA	HIDRAZINA
1	320	280	240	400	200	240
2	480	320	400	280	520	320
4	520	440	560	560	400	480
8	880	920	760	800	760	800
10	3800	3880	1400	1920	5320	6320
12	5450	5280	2560	4200	2920	4240
24	34280	20560	34350	23920	20680	40040
27	23400	34440	39920	44430	48250	37040
30	12550	13470	29420	26400	31840	38290
48	5600	8440	10240	4720	7200	8960

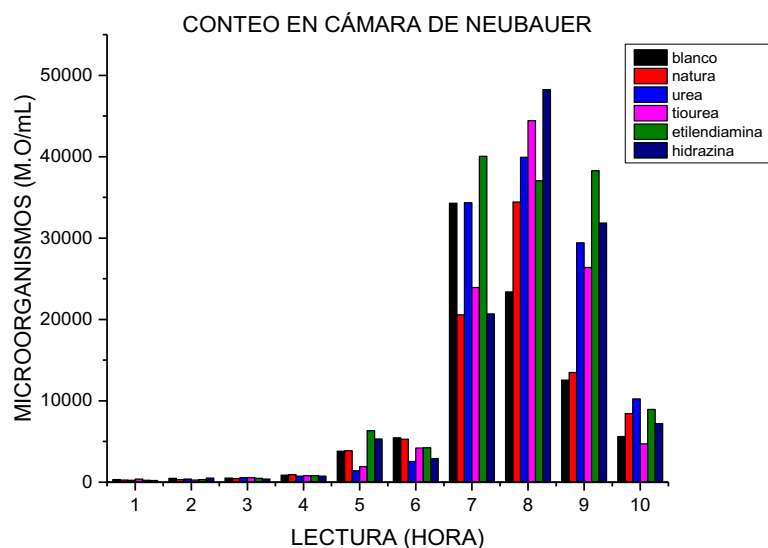


Figura 86 Conteo de bacterias en cámara de Neubauer

La Tabla 24 contiene resultados de un conteo bacteriano (UFC) utilizando la cámara de Neubauer en diferentes condiciones experimentales a lo largo de 48 h. En la hora 1 muestra que el medio de cultivo que contiene OG impurificado con tiourea muestra el mayor conteo bacteriano (400 UFC), mientras que el medio que contiene OG impurificado con etilendiamina presenta el conteo más bajo (200 UFC). En el conteo de las 24 h se observa que el número de bacterias aumenta a 40,040 UFC en el tratamiento que contiene OG

impurificado con hidrazina, también los tratamientos con OG natural y el blanco presentan conteos elevados (20,560 UFC y 34,280 UFC respectivamente). Finalmente, en el último análisis realizado a la hora 48, el tratamiento que contiene OG impurificado con hidrazina se mantiene en su valor, siendo el más alto; mientras que el tratamiento que contiene OG natural y el blanco siguen presentando valores relativamente bajos.

En la Figura 86 se muestran cómo diferentes tratamientos afectan el crecimiento bacteriano en función del tiempo. El tratamiento con hidrazina generalmente resulta en los conteos bacterianos más altos, especialmente después de 10 h. Los tratamientos con urea y tiourea también muestran aumentos significativos en los conteos bacterianos en diferentes momentos. El blanco y el OG natural tienen conteos variables, pero no alcanzan los niveles observados en los tratamientos con hidrazina.

4.5 CRECIMIENTO BACTERIANO CON CELDA ELECTROQUÍMICA

En esta sección se estudia cómo el uso de celdas electroquímicas influye en la proliferación de *Bacillus subtilis* durante la biodegradación de hidrocarburos. Esta parte examina los efectos de la aplicación de potencial eléctrico en el medio de cultivo, destacando cómo las condiciones electroquímicas modifican la actividad bacteriana y la eficiencia del proceso de degradación. Los resultados ofrecen una perspectiva sobre el papel de la electroestimulación en la optimización de técnicas de biorremediación.

4.5.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO

Este estudio cinético se llevó a cabo para determinar, si una fuente de energía eléctrica incrementa la reproducción bacteriana. Se llevó a cabo durante 120 h, las cuales fueron tomadas a 0, 4, 8, 12, 24, 30, 48, 72, 96 y 120 h después de haber sembrado el inóculo en los distintos matraces. De los cuales se obtuvieron los siguientes resultados.

- MEDIO DE CULTIVO NUTRITIVO + BACTERIA (BLANCO)

Tabla 25 Resultados de absorbancia en medio de cultivo inoculado con *B. subtilis* (blanco)

LECTURA	HORAS TRANSCURRIDAS	ABS M1	ABS M2	PROMEDIO
1	0	0.065	0.258	0.161
2	4	0.232	0.058	0.145
3	8	0.094	0.099	0.096
4	12	0.137	0.127	0.132
5	24	0.497	0.482	0.489
6	30	0.658	0.490	0.574
7	48	0.759	0.748	0.753
8	72	0.863	0.893	0.878
9	96	1.078	1.08	1.079
10	120	1.003	0.985	0.994

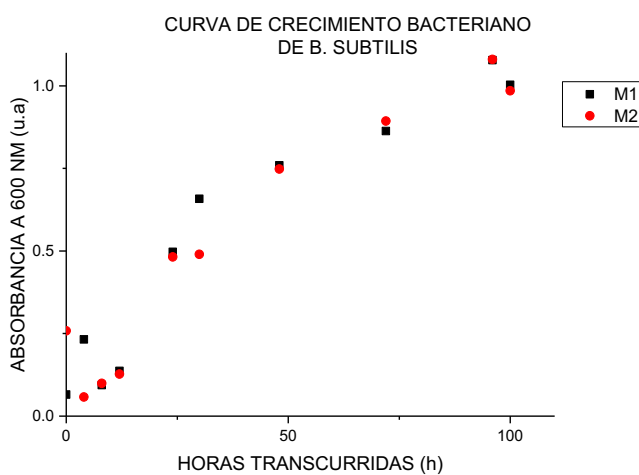


Figura 87 Gráfica de crecimiento bacteriano en medio nutritivo (blanco)

Los valores de absorbancia (ABS) mostrados en la Tabla 25 revelan un aumento gradual en la actividad bacteriana, comenzando con un promedio bajo de 0.1615 U.A en la primera lectura (0 horas) y alcanzando 1.079 U.A a las 96 horas. Las primeras 12 horas muestran

fluctuaciones menores, pero a partir de las 24 horas, el crecimiento se vuelve más evidente, continuando hasta las 96 horas antes de estabilizarse levemente a las 120 horas.

La Figura 87 ilustra claramente este crecimiento progresivo, destacando un incremento constante y sostenido en la densidad óptica a lo largo del tiempo, especialmente después de las 24 horas.

- ELECTRODO SIN TRATAMIENTO (ELECTRODO BLANCO)

Tabla 26 Resultados de absorbancia en celda electroquímica con electrodo sin tratamiento

LECTURA	HORAS TRANSCURRIDAS	ABS M1	ABS M2	PROMEDIO
1	0	0.072	0.101	0.086
2	4	0.084	0.084	0.084
3	8	0.119	0.100	0.109
4	12	0.297	0.126	0.211
5	24	0.208	0.260	0.234
6	30	0.222	0.235	0.228
7	48	0.860	0.806	0.833
8	72	1.711	1.677	1.694
9	96	1.525	1.637	1.581
10	120	1.482	1.602	1.542

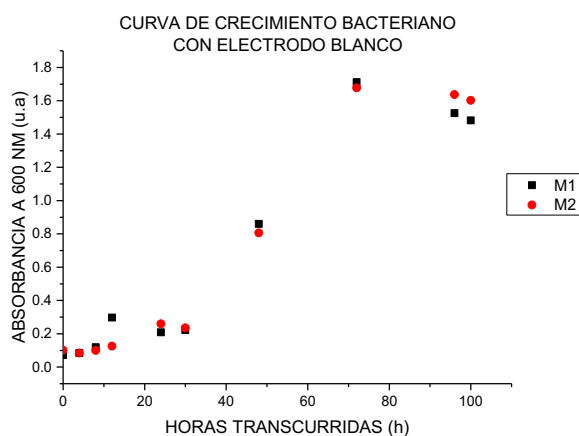


Figura 88 Gráfica de crecimiento bacteriano en celda electroquímica con electrodo sin tratamiento (blanco)

La Tabla 26 señala un incremento en la absorbancia (ABS) a lo largo del tiempo, comenzando con un valor bajo de 0.0865 U.A en la lectura inicial (0 horas) y alcanzando su punto máximo de 1.694 U.A a las 72 horas. Inicialmente, el crecimiento bacteriano es lento, pero a partir de las 12 horas, la densidad óptica empieza a aumentar de manera más notable, con un pico pronunciado a las 72 horas, seguido de una ligera disminución y estabilización hasta las 120 horas.

La Figura 88 refleja este comportamiento, con un ascenso gradual que se intensifica después de las primeras 24 horas, mostrando un claro patrón de crecimiento bacteriano en este periodo.

- ELECTRODO INMERSO EN PVA CON OG NATURAL

Tabla 27 Resultados de absorbancia en celda electroquímica con electrodo inmerso en PVA con OG natural

LECTURA	HORAS TRANSCURRIDAS	ABS M1	ABS M2	PROMEDIO
1	0	0.061	0.061	0.061
2	4	0.241	0.054	0.147
3	8	0.066	0.086	0.076
4	12	0.111	0.142	0.126
5	24	1.077	1.177	1.127
6	30	1.231	1.244	1.237
7	48	1.961	1.991	1.976
8	72	1.383	1.375	1.379
9	96	1.282	1.279	1.280
10	120	1.192	1.207	1.199

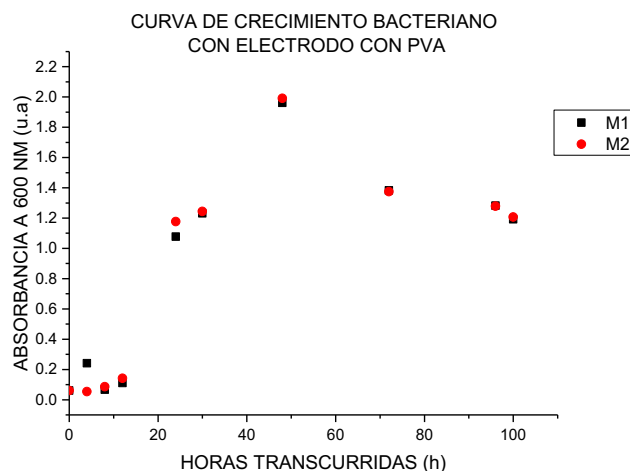


Figura 89 Gráfica de crecimiento bacteriano en celda electroquímica con electrodo inmerso en PVA con OG natural

La Tabla 27 muestra un incremento en la absorbancia (ABS) con el tiempo, comenzando con un valor bajo de 0.061 U.A a las 0 horas, y alcanzando un máximo de 1.976 U.A a las 48 horas. El crecimiento bacteriano es inicialmente lento, con valores bajos hasta las 12 horas, momento en el que la densidad óptica comienza a aumentar de forma más significativa, especialmente a partir de las 24 horas. Posteriormente, se observa un pico a las 48 horas, seguido de una disminución progresiva hasta las 120 horas.

La Figura 89 muestra un crecimiento exponencial hasta las 48 horas, reflejando un patrón típico de crecimiento bacteriano, seguido de una fase de estabilización y declive gradual.

- ELECTRODO INMERSO EN MONOETILENGLICOL CON OG NATURAL

Tabla 28 Resultados de absorbancia en celda electroquímica con electrodo inmerso en monoetilenglicol con OG natural

LECTURA	HORAS TRANSCURRIDAS	ABS M1	ABS M2	PROMEDIO
1	0	0.072	0.073	0.072
2	4	0.069	0.257	0.163
3	8	0.099	0.312	0.205
4	12	0.129	0.315	0.222
5	24	1.421	1.400	1.410
6	30	1.769	1.445	1.607
7	48	1.751	1.720	1.735
8	72	1.495	1.395	1.445
9	96	1.385	1.396	1.390
10	120	1.263	1.312	1.287

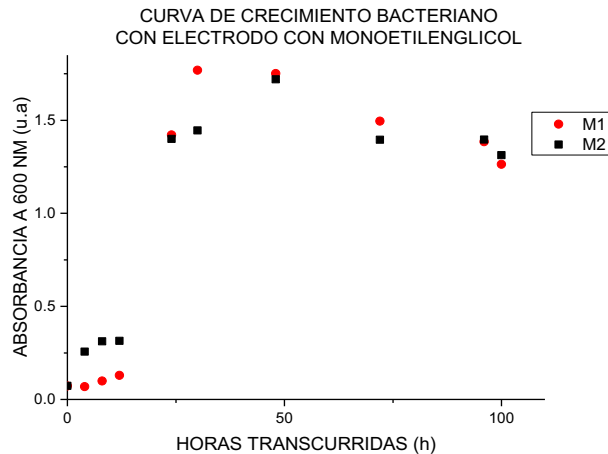


Figura 90 Gráfica de crecimiento bacteriano en celda electroquímica con electrodo inmerso en monoetilenglicol con OG natural

La valoración de la absorbancia (ABS) en función del tiempo es presentada en la Tabla 28, la cual inicia con una fase de adaptación (0 – 12 horas), mostrando que durante las primeras 12 horas, el promedio de absorbancia aumenta ligeramente de 0.0725 a 0.222 U.A, indicando que las bacterias se están adaptando al medio. Posteriormente se muestra la fase exponencial (12 – 30 horas), donde existe un rápido aumento en la absorbancia, alcanzando un número

máximo de 1.607 U.A a las 30 horas, reflejando un crecimiento bacteriano acelerado. Durante las horas 30 a 72 se muestran valores de absorbancia estabilizados alrededor de 1.7355 U.A, mostrando que el crecimiento bacteriano se equilibra con la tasa de muerte celular. Finalmente la fase de muerte se encontró entre las horas 72 y 120, a partir de las 72 horas la absorbancia disminuye gradualmente, indicando una reducción en la viabilidad celular. La Figura 90 muestra una gráfica derivada de estos datos mostrará una curva de crecimiento típica, con una fase de aumento inicial, un pico en la fase exponencial, una meseta en la fase estacionaria y una caída durante la fase de muerte.

- RESULTADOS ESTADÍSTICOS

Se promediaron las repeticiones realizadas de cada variable y se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 29 Resultados de absorbancia en celda electroquímica de cada variable mostrando valores promedio

LECTURA	HORAS TRANSCURRIDAS	BLANCO	ELECTRODO BLANCO	PVA	MONOETI- LENGLICOL
1	0	0.161	0.086	0.061	0.072
2	4	0.145	0.084	0.147	0.163
3	8	0.096	0.109	0.076	0.205
4	12	0.132	0.211	0.126	0.222
5	24	0.489	0.234	1.127	1.410
6	30	0.574	0.228	1.237	1.607
7	48	0.753	0.833	1.976	1.735
8	72	0.878	1.694	1.379	1.445
9	96	1.079	1.581	1.280	1.390
10	120	0.994	1.542	1.199	1.287

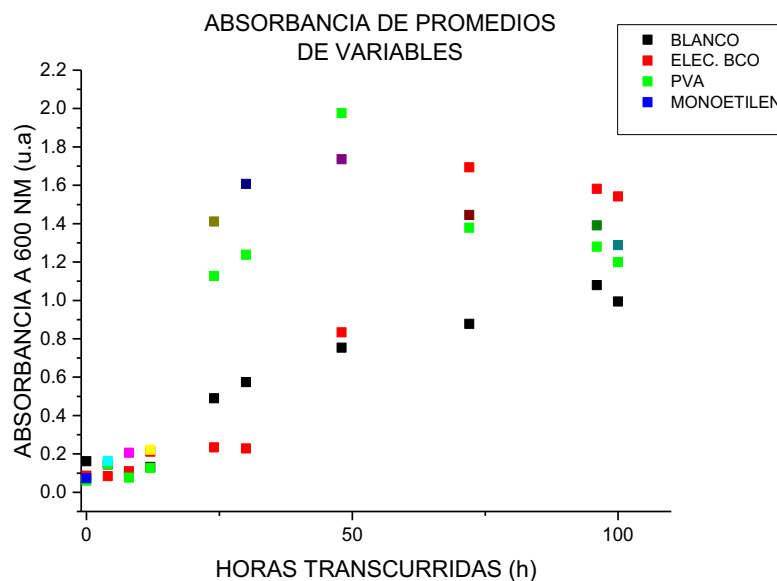


Figura 91 Gráfica de crecimiento bacteriano en celda electroquímica de cada variable promediada

La Tabla 29 muestra el promedio de los resultados de la cinética de crecimiento bacteriano de cada variable bajo diferentes condiciones experimentales. En la lectura 1, la cual se realizó a la hora 0, se observan mediciones iniciales de densidad óptica para cada tratamiento, con valores bajos que representan el punto de partida del experimento. En la hora 24 se observa que el tratamiento con monoetilenglicol muestra un crecimiento significativo de 1.4105 U.A, así mismo, el tratamiento con PVA también muestra un incremento notable en el crecimiento bacteriano (1.127 U.A). En la lectura 10 que corresponden a las 120 h, se encuentra que el crecimiento bacteriano en presencia de electrodos con PVA disminuye ligeramente (1.1995 U.A), en contraste, el blanco y el electrodo con monoetilenglicol muestran una reducción en el crecimiento bacteriano de 0.994 U.A y 1.2875, respectivamente.

Se puede observar en el gráfico de la cinética de crecimiento bacteriano (Figura 91) en la cual se aprecia, la forma en la que diferentes tratamientos afectan el crecimiento bacteriano en función del tiempo. El tratamiento del electrodo con inmersión en PVA generalmente resulta en los mayores incrementos de crecimiento bacteriano; especialmente después de 24 h. El tratamiento con monoetilenglicol también muestra un crecimiento significativo, aunque con algunas fluctuaciones. El blanco y el electrodo blanco presentan crecimientos menores en comparación con los tratamientos con PVA y monoetilenglicol.

Las diferencias en el crecimiento bacteriano entre los tratamientos podrían deberse a las propiedades específicas de cada sustancia (PVA y monoetilenglicol) y cómo estas influyen en la adhesión, nutrición, y proliferación de las bacterias en el medio experimental.

4.5.2 CUANTIFICACIÓN EN CÁMARA DE NEUBAUER CON CELDA ELECTROQUÍMICA

Tabla 30 Resultados de conteo en cámara de Neubauer

LECTURA (HORAS TRANSCU- RRIDAS)	BLANCO	ELECTRODO BLANCO	PVA	MONOETI- LENGLICOL
0	280	920	520	800
12	2450	3640	5840	4840
24	4480	5310	3200	5560
48	6720	5190	5480	5600
72	6280	6480	7200	6720
96	4880	5360	4920	4960
120	3900	4430	4080	4460

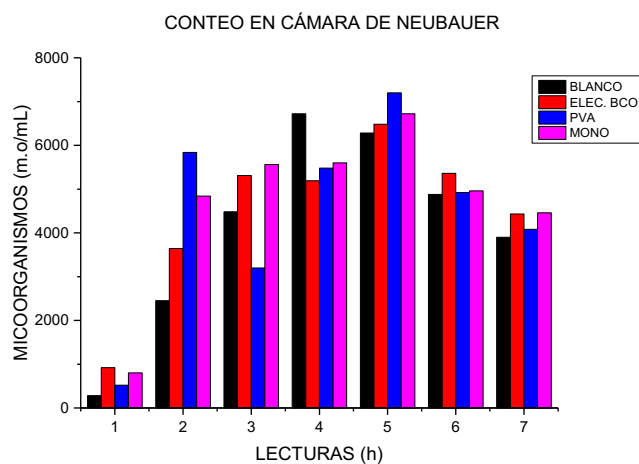


Figura 92 Gráfica de conteo en cámara de Neubauer

Se pueden observar los resultados de la cuantificación en cámara de Neubauer de UFC en la Tabla 30 bajo diferentes condiciones experimentales a lo largo de 120 h. En el tiempo = 0, se observan las mediciones iniciales de recuento bacteriano para cada variable, el blanco tiene un valor de 280 UFC, mientras que en el electrodo sin tratamiento se tiene un valor de 920 UFC. Para el electrodo tomado como referencia (blanco) se encuentra un valor de 920 UFC;

y en los electrodos que fueron sumergidos en PVA y monoetilenglicol, se tuvieron recuentos de 520 UFC y 800 UFC, respectivamente. En la cuantificación de las 24 h, se observa que el número de bacterias sigue aumentando en todas las variables. Finalmente, la hora 120 se observa que el número de UFC tuvo un gran decremento en todos los tratamientos, obteniéndose 3,900 UFC en el blanco, 4,430 UFC en el electrodo blanco, 4,080 UFC en el electrodo con inmersión en la solución de PVA y 4,460 UFC en el electrodo con inmersión en monoetilenglicol.

La gráfica de cuantificación en cámara de Neubauer (Figura 92) se exhibe el comportamiento bajo diferentes tratamientos y la forma en que estos afectan el crecimiento bacteriano en función del tiempo. El tratamiento con PVA resultó en los mayores incrementos iniciales de recuento bacteriano, especialmente a las 12 y 72 h. Sin embargo, después de alcanzar su punto máximo a las 72 h, el recuento bacteriano disminuye para todos los tratamientos. El tratamiento con monoetilenglicol también mostró un crecimiento significativo, aunque con algunas fluctuaciones. El electrodo blanco y el control (blanco) presentan comportamientos similares, con aumentos iniciales seguidos por disminuciones posteriores en el conteo bacteriano.

4.5.3 FOTOGRAFÍAS EN CÁMARA DE NEUBAUER

Las fotografías fueron tomadas bajo el lente 40X de un microscopio biológico compuesto binocular LX400 LABOMED® sobre una cámara de Neubauer HAUSSER SCIENTIFIC® en el cuadrante L1.

A. MEDIO DE CULTIVO NUTRITIVO + BACTERIA (BLANCO)

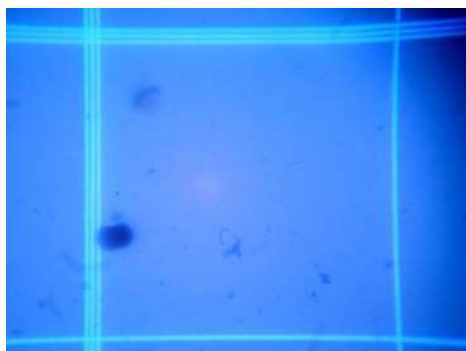


Figura 93 Hora 0

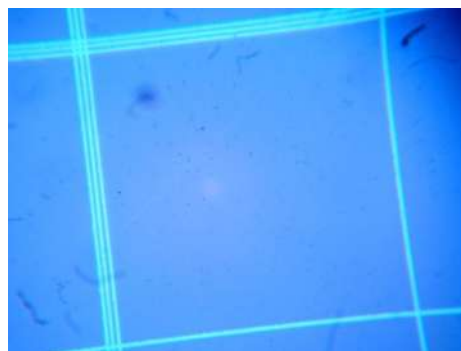


Figura 94 Hora 24

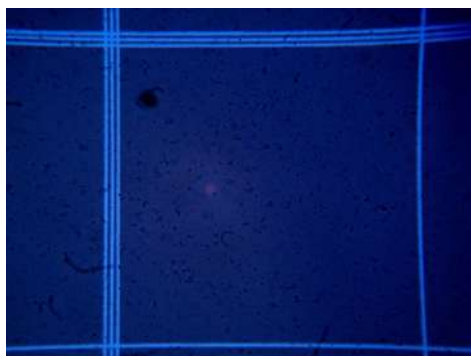


Figura 95 Hora 72



Figura 96 Hora 120

En la Figura 93 se observa la cámara de Neubauer bajo el microscopio, la cual muestra que existen pocas UFC, conforme avanza el tiempo se observa que mayor número de microorganismos, en la hora 72 (Figura 95) exhibe un gran número de UFC en comparación con las 2 Figuras anteriores, lo cual coincide con la curva de crecimiento bacteriano. Esta etapa corresponde a la fase donde existe el mayor número de bacterias, después de ese periodo los microorganismos empiezan a morir, por lo tanto su número disminuye tal como se puede ver en la Figura 96.

B. ELECTRODO CON INMERSO EN MOOETILENGLICOL CON OG NATURAL

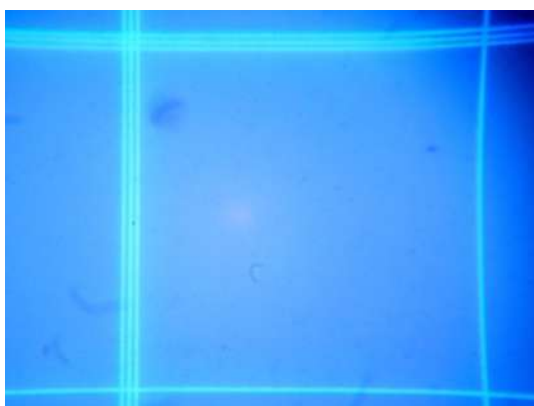


Figura 97 Hora 0

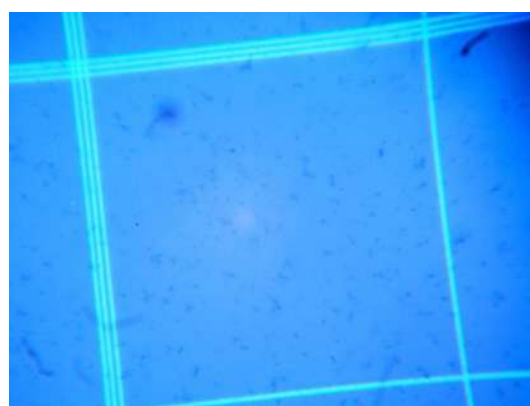


Figura 98 Hora 24

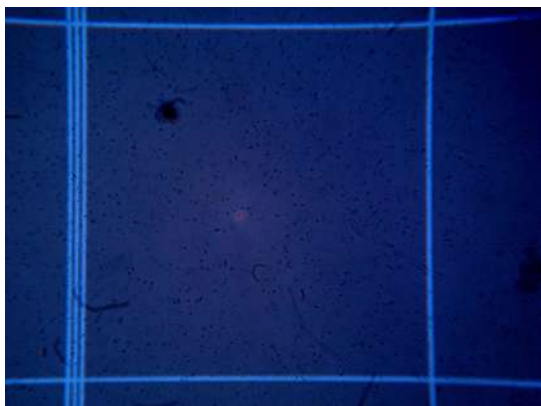


Figura 99 Hora 72

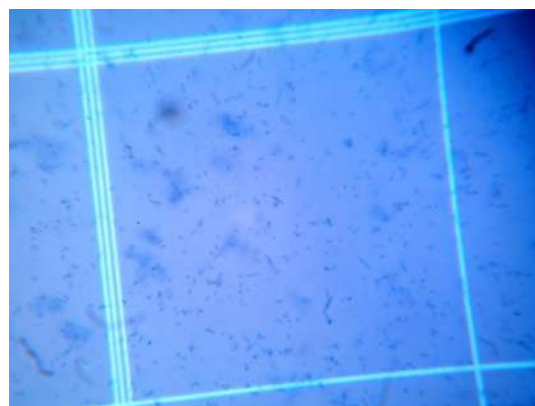


Figura 100 Hora 120

La hora 0 revela un bajo número de UFC inicialmente (Figura 97). A medida que transcurre el tiempo, se observa un aumento en la cantidad de microorganismos. En la hora 72 (Figura 99), se puede ver una proliferación significativa de UFC, correspondiente a la fase de máximo crecimiento bacteriano. Posteriormente, los microorganismos comienzan a morir, lo que lleva a una disminución en su número, tal como lo revela la Figura 100.

4.6 BIODEGRADACIÓN DE ACEITE DE AUTOMOTOR USADO EN CELDA ELECTROQUÍMICA

En este segmento se analiza cómo la utilización de celdas electroquímicas puede mejorar la eficiencia del proceso de biorremediación de hidrocarburos. Este apartado se centra en cómo la aplicación de corriente eléctrica facilita la actividad metabólica de *Bacillus subtilis*, promoviendo una descomposición más rápida y efectiva del aceite automotor usado. Los resultados aportan información valiosa sobre el potencial de las celdas electroquímicas como herramienta para optimizar los procesos de limpieza ambiental en escenarios contaminados por aceites y otros compuestos orgánicos.

4.6.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO CON ACEITE EN ELECTROCELDA ELECTROQUÍMICA CON ELECTRODO INMESRO EN MONOETILENGLICOL CON OG NATURAL

Esta cinética se llevó a cabo con la finalidad de determinar si existe influencia de la energía eléctrica respecto al medio de cultivo genera una mayor degradación del aceite vehicular usado. El tiempo de experimentación fue de 120 h, y se tomaron muestras a las 0, 4, 8, 12,

24, 30, 48, 72, 96 y 120 h, después de que fue sembrado el inóculo en los distintos matraces. De los cuales se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 31 Resultados de absorbancia de medio de cultivo con aceite en una celda electroquímica

LECTURA	HORAS TRANSCURRIDAS	ABS M1	ABS M2	PROMEDIO
1	0	0.234	0.248	0.241
2	4	0.612	0.363	0.487
3	8	0.286	0.313	0.299
4	12	0.250	0.313	0.281
5	24	0.880	1.020	0.950
6	30	0.761	1.155	0.958
7	48	1.392	1.410	1.401
8	72	1.590	1.449	1.519
9	96	1.747	1.747	1.747
10	120	1.921	1.892	1.906

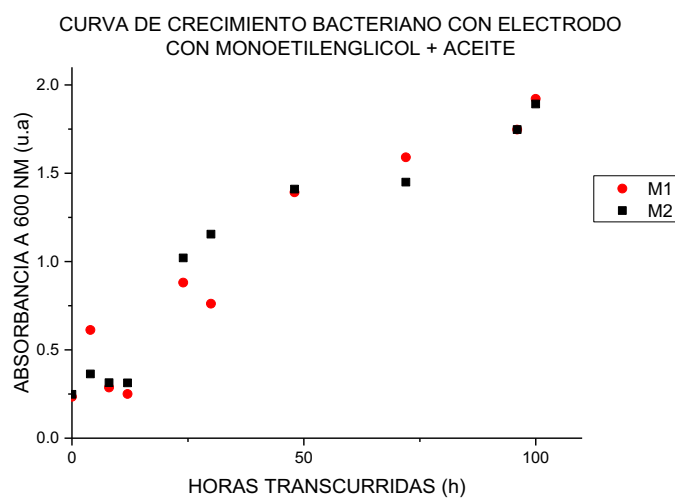


Figura 101 Gráfica de crecimiento bacteriano con aceite en celda electroquímica

En la Tabla 31 se presentan datos de absorbancia para la cinética de crecimiento bacteriano, en la cual se ha medido la densidad óptica en dos muestras (M1 y M2) en un periodo de 120 h. La absorbancia es un indicador del crecimiento bacteriano, correspondiendo a una mayor absorbancia, una mayor cantidad de bacterias presentes.

Al tiempo $t=0$, el cual corresponde a la lectura #1 se muestran valores de absorbancia bajos en ambas muestras, lo cual refleja el punto de partida del experimento. En la lectura 5, transcurridas 24 h, se observa un significativo aumento en la absorbancia en M1 con 0.88 U.A y M2 con 1.02, reflejando un crecimiento bacteriano considerable. La última lectura, la cual fue tomada a las 120 h, aún muestra un valor de absorbancia alto, con una ligera disminución para M2 (1.892 U.A)

La gráfica generada a partir de estos resultados (Figura 101) evidencia un crecimiento bacteriano progresivo a lo largo del tiempo, reflejado en el aumento de los valores de absorbancia. Las muestras iniciales presentan valores bajos, los cuales aumentan significativamente a las 24 h, alcanzan un valor máximo entre 72 y 96 h, y posteriormente se estabilizan. La tendencia general es un incremento en la densidad óptica, indicando una mayor concentración de bacterias en el medio de cultivo.

4.6.2 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE BACTERIAS EN LA CÁMARA DE NEUBAUER EN ACEITE COMO MEDIO DE CULTIVO, EN CELDA ELECTROQUÍMICA CON ELECTRODO INMERSO EN MONOETILENGLICOL Y OG NATURAL

Tabla 32 Resultados de conteo en cámara de Neubauer de medio de cultivo con aceite en celda electroquímica

LECTURAS (HORAS TRANSCURRIDAS)	MEDIO CON ACEITE
0	550
12	2480
24	4400
48	5920
72	6520
96	7190

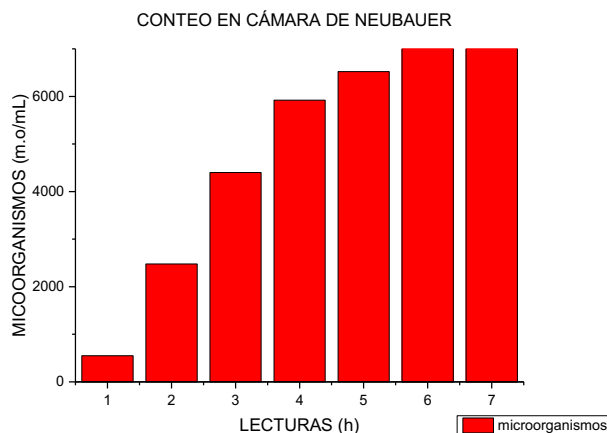


Figura 102 Gráfica de conteo de UFC en cámara de Neubauer

La Tabla 32 indica los resultados obtenidos del conteo de microorganismos en medio de cultivo con aceite vehicular usado durante 96 h. En la hora 0 se tiene el valor inicial de 550 UFC que se encuentran presentes al inicio de la prueba. Es el punto de partida para observar el crecimiento bacteriano. En el conteo de las 24 h se muestra que el crecimiento continúa de manera exponencial (4,400 UFC), casi duplicando el conteo de las 12 h. Esto nos indica una fase de crecimiento logarítmico, donde las bacterias se multiplican rápidamente. La última lectura realizada a la hora 96 lanza un resultado de 7,190 UFC indicando que el conteo de microorganismos sigue aumentando, aunque a un ritmo más lento. Esto sugiere que las bacterias se encuentran entrando en la fase estacionaria, donde el crecimiento neto se estabiliza debido a la limitación de nutrientes o acumulación de productos de desecho. La gráfica de conteo en cámara de Neubauer (Figura 102) muestra las fases del crecimiento bacteriano en un medio con aceite y cómo las condiciones afectan la proliferación de microorganismos.

4.6.3 FOTOGRAFÍAS EN CÁMARA DE NEUBAUER

Las fotografías fueron tomadas bajo el lente 40X de un microscopio biológico compuesto binocular LX400 LABOMED® sobre una cámara de Neubauer HAUSSER SCIENTIFIC® en el cuadrante L1.

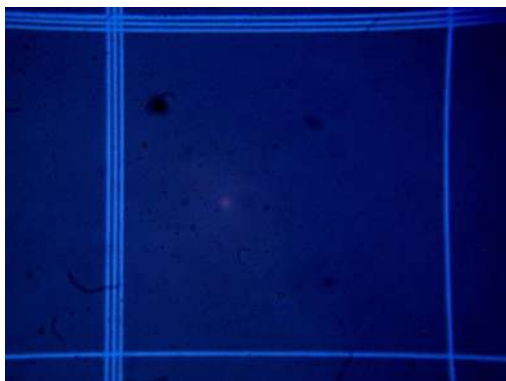


Figura 103 Hora 0

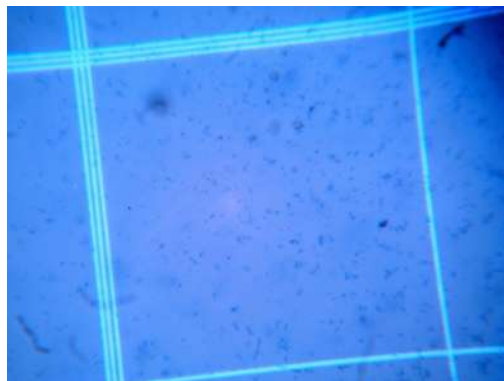


Figura 104 Hora 24

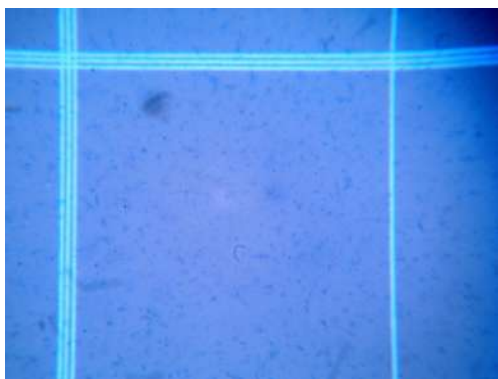


Figura 105 Hora 72

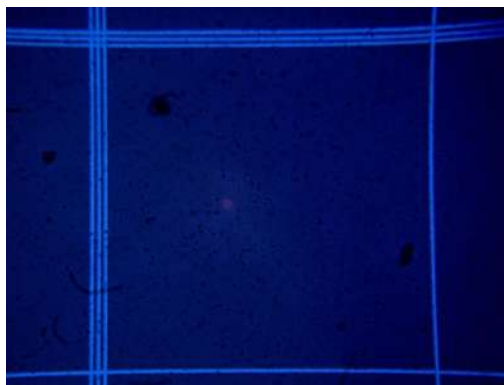


Figura 106 Hora 120

La Figura 103 muestra la cámara de Neubauer bajo el microscopio, mostrando inicialmente pocas UFC. A lo largo del tiempo, se aprecia un incremento en los microorganismos. Transcurridas 72 h (Figura 105), hay un notable aumento de UFC, coincidiendo con el pico de crecimiento bacteriano. Tras este periodo, los microorganismos empiezan a morir, reduciendo su número, lo cual se puede observar en la Figura 120.

4.6.4 PORCENTAJE DE ACEITE DEGRADADO TRAS MÉTODO SOXHLET

Se determinó el porcentaje de aceite degradado aplicando la siguiente fórmula, tras 15 días de inoculada la bacteria y la aplicación del método Soxhlet.

$$\% \text{ de aceite degradado} = \frac{\text{Peso del aceite inicial} - \text{Peso del aceite final}}{\text{Peso del aceite inicial}} \times 100$$

Tabla 33 Datos obtenidos tras la aplicación de método Soxhlet en distintas concentraciones de medio de cultivo

DATOS	MEDIO AL 100%
PESO INICIAL DEL ACEITE	0.562
PESO FINAL DEL ACEITE	0.487
% DE ACEITE DEGRADADO	13.34%

En la Tabla 33 se señalan los datos necesarios para poder determinar el porcentaje de aceite degradado. El peso inicial es de 0.562 g el cual sirve como referencia para evaluar la cantidad de aceite degradado durante el proceso; el peso final es de 0.487 g. Una vez que se obtiene esos datos se generó el porcentaje de aceite degradado, indicando que, durante el experimento, el 13.34% del aceite en el medio fue degradado. Esto sugiere que los microorganismos presentes en el medio tienen la capacidad de degradar el aceite, aunque el porcentaje degradado no es extremadamente alto, indicando una posible necesidad de optimización de condiciones para mejorar la eficiencia de degradación.

4.7 EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DE ACEITE DE AUTOMOTOR USADO EN AGUA

En este punto se examina la capacidad de degradación de hidrocarburos en entornos acuáticos utilizando *Bacillus subtilis*. Esta evaluación se enfoca en cómo diferentes condiciones ambientales, como la presencia de nutrientes o variaciones de pH, afectan la eficiencia de descomposición del aceite automotor. Los resultados obtenidos permiten identificar los

factores que potencian la biodegradación natural, proporcionando bases sólidas para diseñar estrategias de biorremediación más efectivas en cuerpos de agua contaminados por hidrocarburos.

4.7.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO EN ELECTROCELDA ELECTROQUÍMICA CON ACEITE EN AGUA

Este estudio cinético se llevó a cabo con la finalidad de determinar la posibilidad de que la bacteria pueda degradar el hidrocarburo en diferentes proporciones de medios de cultivo en agua de grifo. Se dejó actuar durante 15 días, en los cuáles se midió la densidad óptica cada 24 h, obteniendo así los siguientes resultados.

- MEDIO DE CULTIVO NUTRITIVO + BACTERIA (BLANCO)

Tabla 34 Resultados de densidad óptica en medio de cultivo nutritivo + bacteria (blanco)

LECTURA	DÍAS TRANSCURRIDOS	ABS M1	ABS M2	PROMEDIO
1	0	0.125	0.066	0.095
2	1	0.149	0.230	0.189
3	2	0.256	0.161	0.208
4	5	0.183	0.161	0.172
5	6	0.151	0.137	0.144
6	7	0.172	0.087	0.129
7	9	0.132	0.122	0.127
8	12	0.159	0.141	0.150
9	13	0.107	0.170	0.138
10	14	0.171	0.149	0.160
11	15	0.189	0.041	0.115

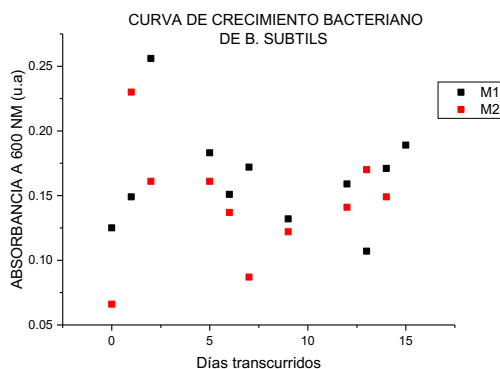


Figura 107 Gráfica de crecimiento bacteriano en medio de cultivo nutritivo + bacteria (blanco)

La Tabla 34 muestra la variación en la absorbancia (ABS) a lo largo de 15 días. Inicialmente, la absorbancia es baja (0.095 U.A el día 0), pero incrementa ligeramente durante los primeros dos días, alcanzando un promedio de 0.208 U.A. A partir del quinto día, se observa una tendencia decreciente en los valores de absorbancia, con fluctuaciones leves, hasta el día 15 donde el promedio cae a 0.115 U.A.

La Figura 107 resalta la ligera subida inicial en los primeros días y la posterior disminución en la absorbancia, lo que sugiere un ajuste en la actividad bacteriana a lo largo del experimento.

- Medio de cultivo al 100%

Tabla 35 Resultados de densidad óptica en medio de cultivo al 100%

LECTURA	DÍAS TRANSCURRIDOS	ABS M1	ABS M2	PROMEDIO
1	0	0.025	0.021	0.023
2	1	0.268	0.107	0.187
3	2	0.367	0.130	0.248
4	5	0.158	0.152	0.155
5	6	0.160	0.184	0.172
6	7	0.159	0.185	0.172
7	9	0.182	0.113	0.147
8	12	0.125	0.194	0.159
9	13	0.140	0.193	0.166
10	14	0.137	0.048	0.092
11	15	0.128	0.061	0.094

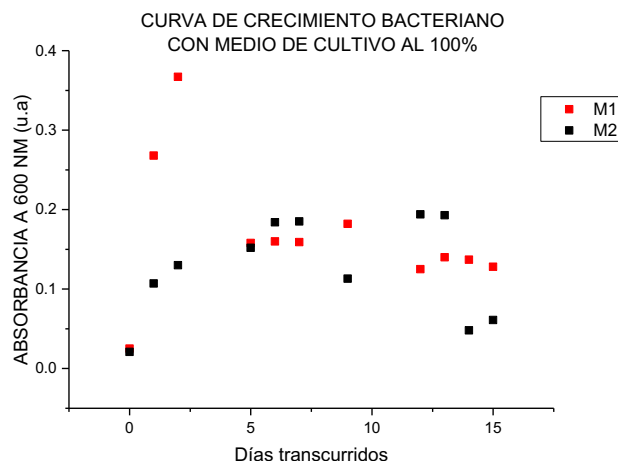


Figura 108 Gráfica de crecimiento bacteriano en medio de cultivo al 100%

La Tabla 35 muestra los resultados de la cinética de crecimiento bacteriano a lo largo de 15 días, reflejando variaciones en la absorbancia (ABS) bajo diferentes condiciones experimentales. Inicialmente, en el día 0, se observa un valor bajo de absorbancia de 0.023 U.A., indicando un crecimiento bacteriano mínimo. A partir del primer día, hay un incremento notable, alcanzando un valor de 0.248 U.A. en el segundo día, lo que sugiere una fase de crecimiento activo. Sin embargo, desde el día 5 hasta el 9, los valores de absorbancia fluctúan levemente entre 0.147 y 0.172 U.A., indicando una estabilización del crecimiento. A partir del día 10, la absorbancia presenta una tendencia a la baja, con una caída más pronunciada en los días 14 y 15, alcanzando los valores más bajos de 0.094 U.A., lo que indica una posible fase de declive o limitación en los recursos disponibles para el crecimiento bacteriano.

La gráfica que representa estos datos (Figura 108) ilustra claramente un patrón de crecimiento inicial, seguido de una meseta y una fase de disminución hacia el final del periodo de observación.

- Medio de cultivo al 50%

Tabla 36 Resultados de densidad óptica en medio de cultivo al 50%

LECTURA	DÍAS TRANSCURRIDOS	ABS M1	ABS M2	PROMEDIO
1	0	0.051	0.098	0.074
2	1	0.110	0.163	0.136
3	2	0.321	0.146	0.233
4	5	0.239	0.175	0.207
5	6	0.135	0.151	0.143
6	7	0.132	0.151	0.141
7	9	0.142	0.112	0.127
8	12	0.082	0.130	0.106
9	13	0.131	0.120	0.125
10	14	0.132	0.187	0.159
11	15	0.203	0.235	0.219

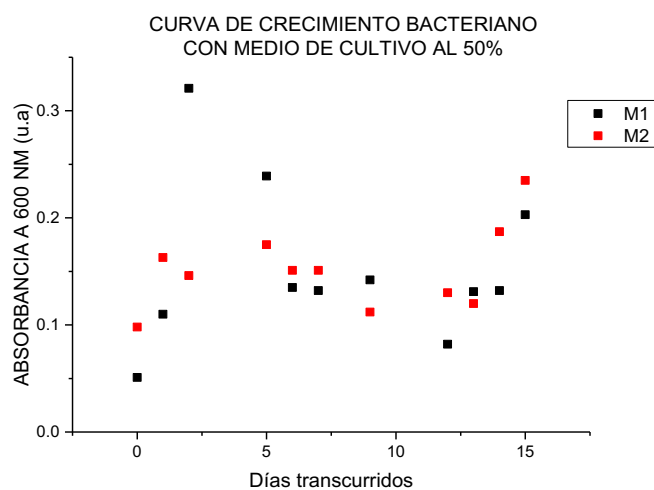


Figura 109 Gráfica de crecimiento bacteriano en medio de cultivo al 50%

Los resultado de la cinética de crecimiento bacteriano durante 15 días, son presentado en la Tabla 36. Se observa un incremento inicial en la absorbancia, que pasa de 0.074 U.A. en el día 0 a 0.233 U.A. en el día 2, indicando un crecimiento activo. Posteriormente, entre los días 5 y 9, los valores de absorbancia fluctúan ligeramente entre 0.127 y 0.207 U.A., sugiriendo una fase de estabilización. Finalmente, se detecta un nuevo aumento en los días 14 y 15,

alcanzando un máximo de 0.219 U.A., lo que podría indicar una recuperación del crecimiento. La gráfica (Figura 109) refleja estos cambios en la densidad óptica, mostrando un patrón de crecimiento, estabilización y recuperación final.

- Medio de cultivo al 20%

Tabla 37 Resultados de densidad óptica al 20%

LECTURA	DÍAS TRANSCURRIDOS	ABS M1	ABS M2	PROMEDIO
1	0	0.037	0.088	0.062
2	1	0.213	0.220	0.216
3	2	0.172	0.214	0.193
4	5	0.185	0.281	0.233
5	6	0.144	0.277	0.210
6	7	0.239	0.129	0.184
7	9	0.172	0.131	0.151
8	12	0.147	0.117	0.132
9	13	0.082	0.221	0.151
10	14	0.146	0.130	0.138
11	15	0.175	0.186	0.180

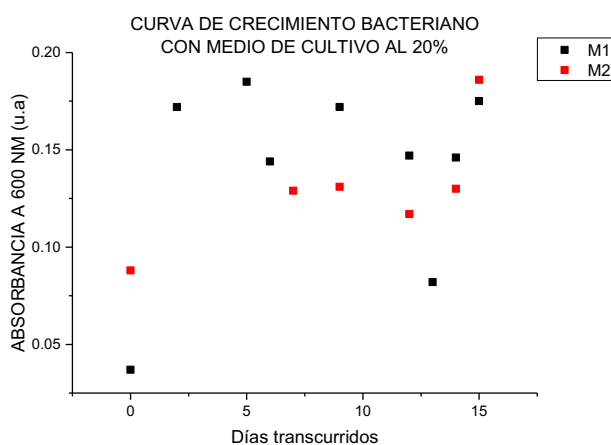


Figura 110 Gráfica de crecimiento bacteriano en medio de cultivo al 20%

La Tabla 37 muestra el crecimiento bacteriano en términos de absorbancia durante 15 días. Inicialmente, se observa un incremento de 0.062 U.A. en el día 0 a 0.216 U.A. en el día 1,

indicando un crecimiento rápido. Posteriormente, la absorbancia fluctúa entre 0.193 y 0.233 U.A. hasta el día 5, reflejando una fase de crecimiento moderado. A partir del día 6, hay variaciones en los valores de absorbancia, manteniéndose relativamente estables y con ligeros aumentos hacia el final del periodo, alcanzando 0.180 U.A. en el día 15.

El gráfico (Figura 110) ilustra estos cambios, con un rápido crecimiento inicial seguido de fluctuaciones y estabilización en los días finales.

- RESULTADOS ESTADÍSTICOS

Se promediaron las réplicas realizadas de cada variable y se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 38 Resultados de absorbancia promedio en diferentes porcentajes de medio de cultivo

LECTURA	DÍAS TRANSCURRIDOS	BLANCO	MEDIO 100%	MEDIO 50%	MEDIO 20%
1	0	0.095	0.047	0.071	0.0596
2	1	0.189	0.594	0.392	0.493
3	2	0.208	1.104	0.656	0.880
4	5	0.172	2.586	1.379	1.982
5	6	0.144	3.072	1.608	2.340
6	7	0.129	3.564	1.847	2.705
7	9	0.127	4.563	2.345	3.454
8	12	0.150	6.075	3.112	4.593
9	13	0.138	6.569	3.353	4.961
10	14	0.160	7.080	3.620	5.350
11	15	0.115	7.557	3.836	5.696

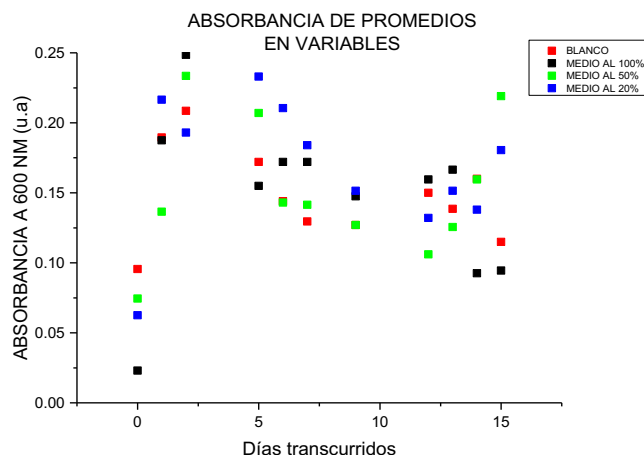


Figura 111 Gráfica de crecimiento bacteriano promediada en diferentes porcentajes de medio de cultivo

En la Tabla 38 se presentan datos de absorbancia que reflejan el crecimiento bacteriano en diferentes proporciones de medio de cultivo a lo largo de 15 días. La absorbancia fue medida en un espectrofotómetro, donde mayores valores indican mayor densidad bacteriana.

En el día 0 se muestran valores bajos en absorbancia, lo que indica la concentración inicial de bacterias en cada medio de cultivo. Durante el día 7 se registraron valores de 3.56 U.A en medio al 100%, 1.84 U.A en medio de cultivo al 50% y 2.70 U.A en medio al 20% lo cual indica que el crecimiento continúa más pronunciado en el medio de cultivo que se encuentra al 100%, mientras que los otros medios también muestran incrementos consistentes. Durante la última lectura se generó la absorbancia máxima, el medio al 100% presentó una absorbancia de 7.55 U.A, el medio al 50% de 3.83 U.A y el medio al 20% 5.69 U.A. Lo que sugiere que el medio más favorable para el crecimiento es el que se encuentra en 100%. Los otros medios también soportan el crecimiento, pero en menor medida.

La gráfica generada a partir de los resultados (Figura 111), muestra que el medio de cultivo al 100% es el más eficaz para el crecimiento bacteriano, alcanzando las mayores lecturas de absorbancia en función del tiempo; los otros medios (50% y 20%) también permiten el crecimiento bacteriano, pero no tan eficiente en comparación el del medio al 100%. La tendencia general en todos los medios muestra un rápido crecimiento inicial, seguido por un crecimiento sostenido y continuo.

4.7.2 CONTEO EN CÁMARA DE NEUBAUER EN CELDA ELECTROQUÍMICA CON ACEITE EN AGUA

Tabla 39 Resultados de conteo en cámara de Neubauer en celda electroquímica con aceite en agua

DÍAS TRANSCURRIDOS	BLANCO	MEDIO 100%	MEDIO 50%	MEDIO 20%
1	260	250	200	140
7	420	490	300	270
10	460	530	300	260
15	300	300	230	220

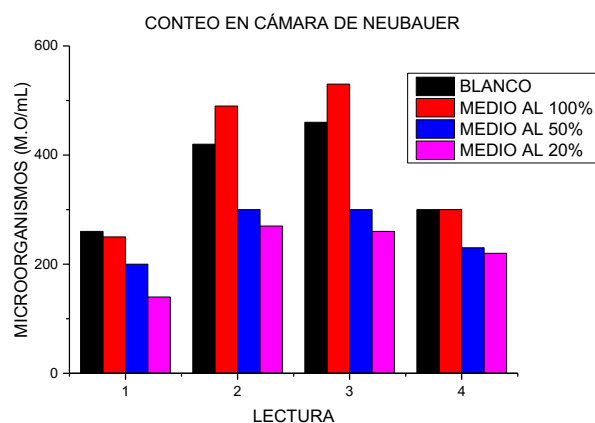


Figura 112 Gráfica de UFC/mL por conteo en cámara de Neubauer

La Tabla 39 presenta los resultados del conteo bacteriano en una cámara de Neubauer en diferentes medios de cultivo a lo largo de 15 días. Los conteos se realizaron en 3 medios de cultivo diferentes (100, 50 y 20%), además de una muestra de referencia blanco. El conteo inicial que se realizó en el día 1 muestra que todos los medios de cultivo contienen un número similar de bacterias al inicio del experimento. En el día 7 se muestra un incremento significativo, teniendo un conteo de 420 UFC en el blanco, 490 UFC en el medio al 100%, 300 UFC en el medio al 50% y 270 UFC en el medio al 20%; demostrando que después de una semana el medio al 100%, muestra el mayor aumento en el conteo bacteriano, seguido por el medio al 50% y el medio al 20%, el blanco también presentó un incremento, pero no tan significativo como el medio al 100%. Durante el último conteo realizado en el día 15 se mostró una disminución en el conteo en todos los medios, el medio al 100% y el blanco

tienen el mismo conteo (300 UFC), mientras que los conteos en el medio al 50% (230 UFC) y el medio al 20% (220 UFC) también disminuyen.

La gráfica de conteo en cámara de Neubauer (Figura 112) sugiere que el medio 100% proporciona condiciones óptimas para el crecimiento bacteriano inicial; sin embargo, factores limitantes eventualmente afectan todos los medios de cultivo; también se observa que el mayor crecimiento se mestrenta en el día 1 y 10, después de lo cual todos los medios muestran una reducción en el conteo, posiblemente indicando la entrada en la fase estacionaria o de muerte en el crecimiento bacteriano.

4.7.3 PORCENTAJE DE ACEITE DEGRADADO TRAS MÉTODO SOXHLET

Se pudo determinar el % de aceite degradado aplicando la siguiente fórmula mencionada en el apartado 4.4.4, en las distintas muestras tras la aplicación del método Soxhlet.

Tabla 40 Datos obtenidos tras la aplicación de método Soxhlet en distintas concentraciones de medio de cultivo

DATOS	MEDIO AL 100% (M1)	MEDIO AL 50% (M2)	MEDIO AL 20% (M3)
Peso inicial del aceite	0.562	0.558	0.560
Peso final del aceite	0.010	0.060	0.470
% de aceite degradado	98.220	89.247	16.071

Tabla 41 Resultados de porcentaje degradado en distintas concentraciones de medio de cultivo

% DE ACEITE DEGRADADO	
M1	98.22
M2	89.24
M3	16.07

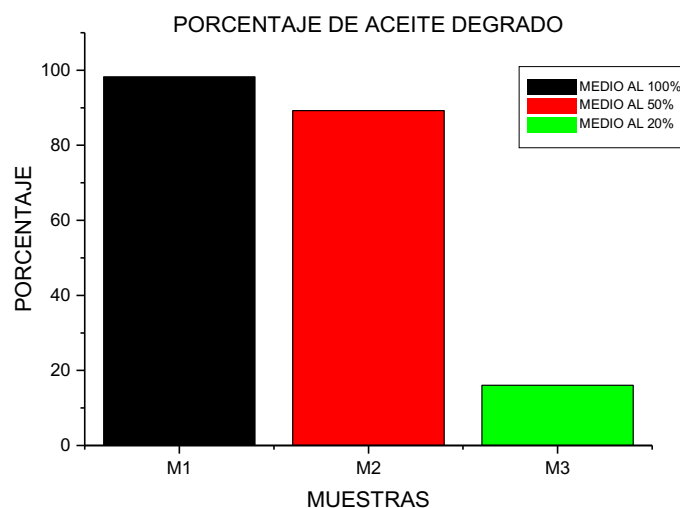


Figura 98 Gráfica de aceite degradado en distintas proporciones de medio de cultivo

Los porcentajes de aceite vehicular usado en los medios de cultivo se muestran en la Tabla 41. En ella se muestra que el medio de cultivo al 100% (M1) genera una degradación del aceite casi completa, con un porcentaje de 98.22%, lo cual sugiere que es altamente eficiente para la biodegradación del aceite. M2 (medio al 50%) obtuvo una degradación de 89.24%, mostrando también que es bastante eficaz, con un porcentaje de degradación de 89.24%, mostrando una capacidad significativa para la biodegradación del aceite. Finalmente se muestra M3 con una degradación de 16.07%, lo que indica que no es adecuado para la biodegradación del aceite.

En la Figura 98 se presenta la gráfica de aceite degradado en las distintas proporciones de medio de cultivo, la cual sugiere que el medio al 100% (M1) es el más efectivo para la biodegradación del aceite, seguido por M2 y M3, por otro lado, donde no se proporciona un entorno adecuado para una degradación efectiva.

4.8 EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DEL HIDROCARBURO EN SUELO

En esta fracción se investiga cómo *Bacillus subtilis* degrada hidrocarburos en matrices terrestres. Este apartado analiza los efectos de distintos factores, como la textura del suelo, el contenido de humedad y la disponibilidad de oxígeno, en la eficiencia del proceso de biorremediación. Los resultados obtenidos ayudan a identificar las condiciones óptimas para la degradación del aceite automotor usado en suelos contaminados, proporcionando estrategias para mejorar la recuperación ambiental en áreas afectadas.

4.8.1 PORCENTAJE DE ACEITE DEGRADADO TRAS MÉTODO SOXHLET

Esta prueba se llevó a cabo con la finalidad de determinar en cuántos gramos de tierra puede generar un mayor porcentaje de degradación del hidrocarburo la bacteria.

No se realizaron pruebas espectrofotométricas ni conteo en cámara de Neubauer, solo se realizó la prueba para determinación de porcentaje de aceite degradado mediante la prueba Soxhlet.

Se aplicó la fórmula mencionada en el apartado 4.4.4 en las distintas muestras tras el proceso mencionado anteriormente.

Tabla 42 Datos obtenidos tras la aplicación de método Soxhlet en distintas cantidades de suelo

DATOS	10 G DE SUELO – CORRIENTE ELÉCTRICA (M1)	10 G DE SUELO + CORRIENTE ELÉCTRICA (M2)	50 G DE SUELO + CORRIENTE ELÉCTRICA (M3)	100 G DE SUELO + CORRIENTE ELÉCTRICA (M4)
PESO INICIAL DEL ACEITE	0.549	0.553	0.521	0.548
PESO FINAL DEL ACEITE	0.37	0.1	0.22	0.33
% DE ACEITE DEGRADADO	32.60	81.91	57.77	39.78

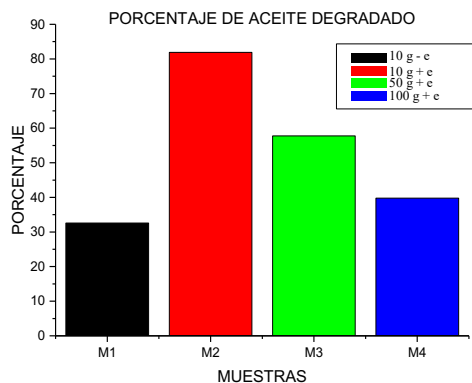


Figura 113 Gráfica de aceite degradado en distintas cantidades de suelo.

Los porcentajes de aceite vehicular usado en los medios de cultivo se muestran en la Tabla 42, en ella se presume que en 10 g de suelo tiene una repercusión cuando se añade energía a través del flujo de corriente eléctrica (M2), se tiene una degradación mucho mayor (81.92%) en comparación con la muestra que no contiene energía eléctrica (M1) con un resultado de solo 32.60%; lo cual indica que la electricidad tiene un efecto positivo considerable en la biodegradación del aceite. En M3 se tuvo una degradación de 57.77%, que sigue siendo una degradación significativa y finalmente M4 generó una degradación del aceite de 39.78%, lo cual muestra una degradación mayor que sin corriente eléctrica (M1), pero menor que con menores cantidades de suelo y electricidad (M2 y M3).

La Figura 113 muestra que la aplicación de corriente eléctrica (M2, M3 y M4) mejora significativamente la degradación del aceite, en comparación con el suelo sin electricidad, (M1). M2, en particular, muestra una degradación excepcionalmente alta de 81.92%, evidenciando el fuerte efecto positivo de la corriente eléctrica. La cantidad de suelo también afecta la eficiencia de la degradación del aceite. Al utilizar 10 g de suelo, la degradación es máxima con la corriente eléctrica aplicada (M2). Se observa que a medida que aumenta la cantidad de suelo, la eficiencia de degradación disminuye (M3 y M4), como era de esperarse.

4.9 EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DEL HIDROCARBURO EN SUELO UTILIZANDO ÓXIDO DE GRAFENO IMPURIFICADO CON HIDRAZINA.

En esta sección se examina la biodegradación de hidrocarburos en suelo utilizando óxido de grafeno impurificado con hidrazina. Este estudio se enfoca en cómo la aplicación de este material influye en la eficiencia del proceso de biorremediación. Se consideran factores como la interacción del óxido de grafeno con el suelo y su impacto en la actividad microbiana. Los resultados obtenidos permiten identificar las condiciones óptimas para la degradación de hidrocarburos, ofreciendo estrategias innovadoras para la recuperación de suelos contaminados.

4.9.1 PORCENTAJE DE ACEITE DEGRADADO TRAS MÉTODO SOXHLET.

Esta prueba se llevó a cabo con la finalidad de determinar si con el OG impurificado con hidrazina puede generar un mayor porcentaje de degradación del hidrocarburo la bacteria que en la prueba anterior, en la cual se realizó con OG sin impurificar.

No se realizaron pruebas espectrofotométricas ni conteo en cámara de Neubauer, solo se realizó la prueba para determinación de porcentaje de aceite degradado mediante la prueba Soxhlet.

Se aplicó la fórmula mencionada en el apartado 4.4.4 en las distintas muestras tras el proceso mencionado anteriormente.

- Día 7

Tabla 43 Datos obtenidos tras la aplicación de método Soxhlet en distintas cantidades de suelo tras 7 días de inoculación

DATOS	10 G DE SUELO – CORRIENTE ELÉCTRICA (M1.7)	10 G DE SUELO + CORRIENTE ELÉCTRICA (M2.7)	50 G DE SUELO + CORRIENTE ELÉCTRICA (M3.7)	100 G DE SUELO + CORRIENTE ELÉCTRICA (M4.7)
PESO INICIAL DEL ACEITE	0.553	0.522	0.521	0.586
PESO FINAL DEL ACEITE	0.35	0.44	0.33	0.552
% DE ACEITE DEGRADADO	36.70	15.70	36.66	5.80

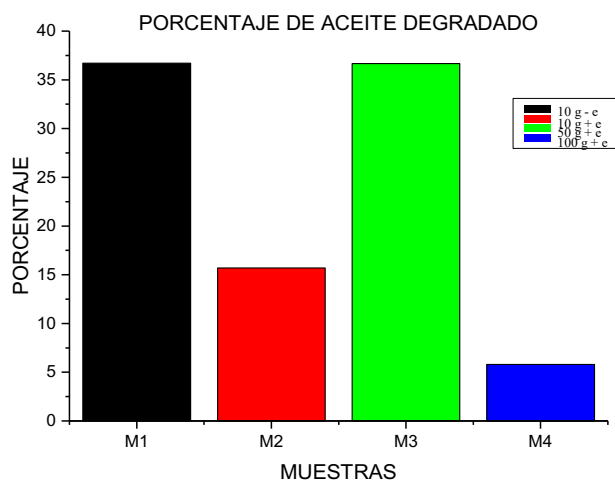


Figura 114 Gráfica de aceite degradado en distintas cantidades de suelos tras 7 días de inoculación

La Tabla 43 muestra los porcentajes de aceite degradado en distintas cantidades de suelo, las muestras M1.7 y M2.7 contienen la misma cantidad de suelo (10 g) pero M1.7 sin añadir energía eléctrica y M2.7 añadiendo 10 V de energía eléctrica, se observa que sin aplicar energía eléctrica la degradación del aceite fue de 36.71%, el cual se considera un nivel moderado de biodegradación, mientras que por otro lado a la muestra que se le añadió energía eléctrica produjo una degradación notablemente baja, con solo 15.71%. M3.7 pudo degradar

un 36.66%, similar a la observada en M1.7. Por último, en M4.7 obtuvo una degradación de aceite mínima, con solo 5.80%.

La Figura 114 exhibe la gráfica de aceite degradado en distintas cantidades de suelo tras 7 días de inoculación destacando que la aplicación de energía eléctrica no mejora la degradación del aceite en las concentraciones de suelo estudiadas. De hecho, en el caso de 10 g de suelo (M2.7), la energía eléctrica parece tener un efecto adverso, reduciendo la degradación en comparación con el suelo sin energía eléctrica (M1.7). La menor degradación se produjo en M4.7, lo cual indica que en alta concentración de suelo junto con energía eléctrica no es efectiva para la biodegradación del aceite.

- Día 15

Tabla 44 Datos obtenidos tras la aplicación de método Soxhlet en distintas cantidades de suelo tras 15 días de inoculación

DATOS	10 G DE SUELO – CORRIENTE ELÉCTRICA (M1)	10 G DE SUELO + CORRIENTE ELÉCTRICA (M2)	50 G DE SUELO + CORRIENTE ELÉCTRICA (M3)	100 G DE SUELO + CORRIENTE ELÉCTRICA (M4)
PESO INICIAL DEL ACEITE	0.574	0.512	0.587	0.533
PESO FINAL DEL ACEITE	0.02	0.06	0.14	0.28
% DE ACEITE DEGRADADO	96.51	88.28	76.14	47.46

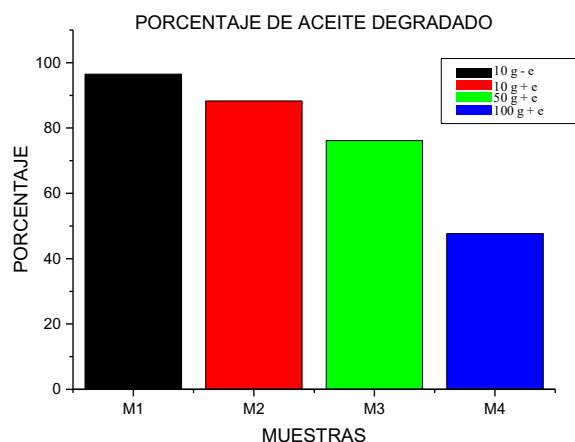


Figura 115 Gráfica de aceite degradado en distintas cantidades de suelos tras 7 días de inoculación

La Tabla 44 muestra los porcentajes de aceite degradado en distintas cantidades de suelo, las muestras M1.15 y M2.15 contienen la misma cantidad de suelo (10 g) pero M1.15 sin añadir corriente eléctrica y M2.15 añadiendo 10 V de energía eléctrica, se observa que en ausencia de energía eléctrica, la degradación de aceite fue muy alta, lográndose 96.52% de degradación del aceite. También se presenta una degradación considerable en M2.15, de 88.28%, aunque ligeramente menor que en M1, sigue siendo una degradación significativa, indicando que la energía eléctrica tiene un efecto positivo en la biodegradación. En la muestra que contiene 50 g de suelo con energía eléctrica se generó una degradación del 76.15%, con esto se muestra una buena eficiencia en la degradación, aunque menor que en M1.15 y M2.15, lo que sugiere que la cantidad de suelo influye en la efectividad del proceso. La última muestra (M4.15) fue la menor, con solo un 47.47% de aceite degradado.

La Figura 115 exhibe la gráfica de aceite degradado en distintas cantidades de suelo, tras 15 días de inoculación, indicando que una mayor cantidad de suelo reduce la eficiencia de la biodegradación, inclusive al aplicar electricidad.

4.10 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se evaluó la degradación de aceite bajo diferentes condiciones experimentales, variando la cantidad de suelo y la aplicación de corriente eléctrica. A continuación, se discuten los resultados obtenidos. Obtenidos a partir de diversas tablas de datos que analizan la degradación de aceite y el crecimiento bacteriano en diferentes medios de cultivo y condiciones experimentales.

4.10.1 EFECTO DE LA CORRIENTE ELÉCTRICA Y CANTIDAD DE SUELO

- 10 g de Suelo – Corriente eléctrica (M1.7 y M1.15)

La degradación del aceite fue alta, con valores de 36.71% y 96.52%, respectivamente. Estos resultados indican que para pequeñas cantidades de suelo, en ausencia de energía eléctrica puede lograrse alta eficiencia de degradación.

- 10 g de Suelo + corriente eléctrica (M2.7 y M2.15)

La degradación del aceite fue de 15.71% y 88.28%, respectivamente. La corriente eléctrica mejoró la degradación en M2.15 en comparación con M2.7, sugiriendo que la efectividad de la corriente eléctrica puede depender de otros factores no controlados en estos experimentos.

- 50 g de Suelo + corriente eléctrica (M3.7 y M3.15)

La degradación fue del 36.66% y 76.15%, respectivamente. Aunque ambos valores son altos, el porcentaje de degradación disminuye con el aumento de la cantidad de suelo, lo que indica que la corriente eléctrica es menos efectiva en mayores cantidades de suelo.

- 100 g de Suelo + corriente eléctrica (M4.7 y M4)

La degradación fue del 5.80% y 47.47%, respectivamente. Estos son los valores más bajos de todos los experimentos, indicando que una mayor cantidad de suelo reduce

significativamente la eficiencia de la biodegradación, incluso con la aplicación de corriente eléctrica.

4.10.2 CRECIMIENTO BACTERIANO DETERMINADO MEDIANTE ABSORBANCIA Y CONTEO EN CÁMARA DE NEUBAUER

En este apartado se discute el crecimiento bacteriano evaluado a través de la absorbancia y el conteo en la cámara de Neubauer. Se analiza cómo estos métodos complementarios permiten un seguimiento preciso de la proliferación bacteriana, proporcionando una visión integral del proceso de crecimiento. Los resultados obtenidos permiten comparar la eficacia de ambos enfoques, destacando las variaciones observadas en diferentes condiciones experimentales y ofreciendo una comprensión más profunda de la dinámica bacteriana en el medio estudiado.

4.10.2.1 CRECIMIENTO BACTERIANO MEDIDO POR ABSORBANCIA

Se observó un aumento en la absorbancia en todos los medios de cultivo a lo largo del tiempo. El crecimiento bacteriano fue más pronunciado en el medio al 100%, seguido por el medio al 50% y el medio al 20%. El blanco presentó el menor crecimiento, como era de esperarse. Esto sugiere que concentraciones más altas de nutrientes favorecen un mayor crecimiento bacteriano.

4.10.2.2 CONTEO BACTERIANO EN CÁMARA DE NEUBAUER

- Sin corriente eléctrica

Se observó un aumento en el conteo bacteriano en los primeros 10 días, seguido de una disminución hacia el día 15 en todos los medios, lo que indica una típica curva de crecimiento bacteriano con fases estacionaria, logarítmica y de muerte.

- Con corriente eléctrica

Los conteos iniciales eran similares, pero el crecimiento bacteriano fue mayor en los medios con menor cantidad de suelo (10 g y 50 g). En 100 g de suelo, el crecimiento fue menor, lo

que sugiere que la corriente eléctrica puede tener un efecto inhibitor en grandes volúmenes de suelo.

4.10.3 COMPARACIÓN GENERAL DE DEGRADACIÓN DE ACEITE

- Concentraciones de Suelo y Degradación de Aceite

En general, la degradación del aceite fue mayor en condiciones de menor cantidad de suelo, en presencia o ausencia de corriente eléctrica. Los mejores valores de eficiencia se observaron en los tratamientos sin corriente eléctrica, con 10 g de suelo, sugiriendo que en ciertos escenarios, la corriente eléctrica puede no ser necesaria o incluso puede inhibir el proceso de degradación.

- Impacto de la corriente eléctrica

La aplicación de corriente eléctrica mostró efectos mixtos. En algunos casos, mejoró la degradación del aceite (como en M2), pero en otros, fue menos efectiva o incluso inhibió la degradación en mayores cantidades de suelo (como en M4). Esto sugiere que la corriente eléctrica puede ser beneficiosa bajo condiciones específicas y debe ser evaluada cuidadosamente.

4.10.4 DISCUSIÓN GENERAL

El estudio revela que la degradación de aceite y el crecimiento bacteriano en suelos son fuertemente influenciados por la cantidad de suelo y la presencia de corriente eléctrica. En menores cantidades de suelo, se observa una mayor eficiencia de degradación, permaneciendo inocuo a la aplicación de corriente eléctrica. La energía eléctrica, sin embargo, no siempre mejora la degradación y puede ser menos efectiva en mayores concentraciones de suelo.

Para optimizar la biodegradación del aceite en suelos, se recomienda realizar experimentos adicionales que consideren variables y condiciones adicionales, incluyendo la interacción entre la cantidad de suelo, la energía eléctrica y otros factores ambientales. Además, el uso

de distintas concentraciones de medios de cultivo puede influir significativamente en el crecimiento bacteriano, lo cual es crucial para el diseño de estrategias de biorremediación efectivas.

5. CONCLUSIONES

En base a la hipótesis y objetivos establecidos al inicio de este proyecto, fue posible evaluar la factibilidad de que el óxido de grafeno actúe como promotor del crecimiento bacteriano de *Bacillus subtilis* en un proceso de electrobiorremediación de suelos contaminados con aceite de automotor usado. Se realizaron pruebas espectrofotométricas, conteos de unidades formadoras de colonias (UFC), y análisis de arrastre de grasas mediante el método Soxhlet en medios de cultivo, considerando distintas proporciones de suelo y electrodos, los cuales fueron sometidos a diferentes tratamientos de inmersión en diferentes medios, resultando correcta nuestra hipótesis inicial, dado que el óxido de grafeno mejoró la reproducción de bacterias.

Los resultados obtenidos demuestran una alta efectividad en la degradación del aceite, en la muestra que contenía 10 g de suelo incubado por 15 días y en ausencia de corriente eléctrica alcanzando un 96.51%. Este porcentaje se considera extremadamente alto y se atribuye a diversas razones, incluyendo las condiciones ambientales del medio de cultivo como el pH, temperatura y la disponibilidad del medio de cultivo. También existió una degradación considerablemente alta del 88.28% en el medio de cultivo que contenía 10 g de suelo incubado por 15 días y con aplicación de un voltaje de 1.5 V, lo cual puede explicarse por la interferencia de los campos eléctricos en los procesos bioquímicos de las bacterias.

En perspectiva, el presente estudio demuestra que el óxido de grafeno es un efectivo promotor del crecimiento bacteriano en procesos de biorremediación, y que los factores cantidad de suelo y la aplicación de corriente eléctrica son cruciales; razón por lo cual, deben ser considerados para optimizar la degradación de contaminantes en suelos. Estos resultados obtendios proporcionan una base prometedora para futuras investigaciones y aplicaciones prácticas en el campo de la biorremediación.

5.1 CONSIDERACIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES

- Optimización de condiciones experimentales:

Es crucial realizar experimentos adicionales para optimizar las condiciones de biorremediación, evaluando factores como la intensidad de la corriente eléctrica, la humedad del suelo, la temperatura y la presencia de otros nutrientes o inhibidores en el suelo.

- Evaluación de la corriente eléctrica en diferentes contextos:

La aplicación de energía eléctrica debe ser evaluada cuidadosamente en función de las características del suelo y del contaminante específico. Es posible que en ciertos casos, la corriente eléctrica no sea necesaria o incluso puede ser perjudicial, como se observó en algunas muestras con mayores cantidades de suelo.

- Diseño de Estrategias de Biorremediación:

Los resultados sugieren que las estrategias de biorremediación deben ser diseñadas de manera específica para cada sitio contaminado, teniendo en cuenta factores como la cantidad de suelo, la concentración de contaminantes y las condiciones ambientales locales.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Calle, P. (2017). *El Grafeno: Propiedades y Aplicaciones*. Murcia, España: Grapheno Nanotchnologies.
- Callister, W. D. (2007). Materials science and engineering: an introduction. *Jhon Wiley & ,* 665-715.
- Carmona, J. G. (2012). Electrónica del grafeno. *Investigación y ciencia*, 42-49.
- Castelló, J. (2022). *Evaluación de tres formulaciones diferentes de aceites lubricantes y su impacto en el mantenimiento de una flota de autobuses*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- Castro, A. H. (2011). The electronic properties of graphene. *Reviews of modern physics*, 109-111.
- Leabana, S. K. (2017). Diversity, Biodegradation and Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. . *Environmental bioremediation technologies*. S.N. Singh y R.D. Tripathi, 409-443.
- León, D. (2001). *Evaluación de metodología microbiana y molecular para la detección de Bacillus subtilis en microorganismos de suelo*. Ciudad de México, México : Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
- León, N., & Arias, M. &. (2020). Biodegradability of Venezuela crude oils. *International conference on health, safety, and environment in oil and gas exploration and production* (págs. 7-10). Caracas, Venezuela: SPE.
- Li, J. &. (2014). Antibacterial activity of large-area monolayer graphene film manipulated by charge transfer. *Energy Fuels*, 489-504.
- Lisboa, M. (2003). Efectividad de Bacillus Subtilis. *Universidad de Talca*, 10-13.
- Cogollo, J. (2017). *Diagnóstico de la generación y manejo de aceites vehiculares usados en establecimientos de servicio automotriz* . Córdoba, Perú : Universidad de Córdoba .

- Cota, K., & Nuñez, J. &. (2018). *Biorremediación: Actualidad de conceptos y aplicaciones*. Chihuahua, México: Universidad Autónoma de la Ciudad de Chihuahua.
- LUBTEC. (22 de Julio de 2022). *Los 5 principales beneficios del usar aceite sintético*. Obtenido de LUBTEC: <https://lubtec.com.pe/beneficios-usar-aceite-sintetico/>
- Ávila, C. L. (2013). Nitroxide-functionalized graphene oxide form graphite oxide. *Carbon* 63, 376-389.
- Alba, G. (2013). *Estudio comparativo de tres diferentes métodos de remediación de suelo tipo gleysol contaminado con hidrocarburo*. Querétaro, México: Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica.
- ANT. (17 de febrero de 2016). *Agencia Nacional de Tránsito*. Obtenido de 42-208: <http://www.astm.org>
- Avallone, E. B. (2015). Manual del ingeniero mecánico . *McGraw Hill*, 67-70.
- Barrera, L. &. (2015). *Diagnóstico de la contaminación ambiental causada por aceites usados provenientes del sector automotor y planteamiento de soluciones viables para el gobierno autónomo descentralizado del cantón azogues*. Cuenca, Colombia: Universidad Politécnica Salesiana .
- Builes, S. (2007). Biodegradación de aceites usados. *El Cid Editor - Ingeniería*, 5-6.
- Bustos, F. (2017). *Manual de gestión y control ambiental*. Guanajuato: RN: Industria gráfica.
- Das, N. (2021). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnology Research International*, 1-13.
- Das, S. &. (2014). Microbial Bioremediation: A Potential Tool for Restoration of Contaminated Areas. *Microbial Biodegradation and Bioremediation*. , 1-22.
- De La Rosa, D., & Teutli, M. &. (2007). ELECTORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS, UNA REVISIÓN TÉCNICA PARA SU APLICACIÓN EN CAMPO. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 129-138.

- De Mesa, J. Q. (2006). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. *NOVA*, 82-90.
- Dua, M., & Singh, A. &. (2012). Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Appl Microbiol Biotechnol*, 43-52.
- Dzionic, A., & Wojcieszynska, D. &. (2016). Natural Carriers in Bioremediation: A Review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 28-36.
- Earl, A. L. (2019). Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiol*, 1-11.
- Enriquez, G. (2016). *Diagnóstico del impacto ambiental causado por los aceites automotrices usados en la ciudad de Piñas, El Oro, Ecuador*. Cuenca, Ecuador: Universidad del Azuay .
- Espinoza, J. (22 de 12 de 2022). *Caracterización del proceso de Bacillus subtilis bajo condiciones anaerobias*. Obtenido de Universidad Nacional Autónoma de México : <pbr322.ibt.unam.mx/~alfredo/JoelEspinosa.pdf
- García, L., & Ramírez, M. &. (2011). Electrorremediación de suelos arenosos contaminados por Pb, Cd y As provenientes de residuos mineros, utilizando agua y ácido acético como electrolitos. *Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales*, 24-29.
- García-Guirado, C. (2020). *Aplicaciones biomédicas del óxido de grafeno*. Sevilla, España: Universidad de Sevilla, Facultad de farmacia.
- García-Martínez, V. (2019). *Estudio de la estabilidad del óxido de grafeno con el tiempo*. Santiago, Chile: Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica.
- Guo, Z. S. (2021). Surface Functionalization of Graphene-Based Materials: Biological Behavior, Toxicology, and Safe-By-Design Aspects. *Angewandte Chemie International*, 4986-4997.
- Hasanuzzaman, M. U. (2007). Degradation of long-chain n-alkanes (C 36 and C 40) by *Pseudomonas aeruginosa* strain WatG. *International biodeterioration and biodegradation*, 40-43.

- Hervás, J. (2021). . Evaluación de tres formulaciones diferentes de aceites lubricantes y su impacto en el mantenimiento de una flota de autobuses. *Universitat Politècnica de Valencia*, 25-28.
- INECC. (12 de Junio de 2019). *Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático*. Obtenido de Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático: <http://INECC/contenido.bce.fin.gob/EstMacro012014>
- Jalilzadeh, R. S. (2017). Comparative study of bioremediation of crude oil by *Bacillus subtilis* and organic substances. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, 221-263.
- Jabeen, S. S. (2022). The biodegradation of crude oil by *Bacillus subtilis* isolated from contaminated soil in hot weather areas. *International Journal of Environmental Research*, 509-514.
- Kokalis, B. N. (2006). Plant growth promoting Rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous Rhizosphere microorganisms. *Applied Soil Ecology*, 91-100.
- Koneman, E. (2001). *Diagnostico microbiológico: Texto y atlas de color*. Buenos Aires, Argentina : Editorial Médica Panamericana .
- Kuilaa T., B. S. (2011). Recent advances in graphene-based biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 4637-4648.
- Mártinez, J. (2015). *Desarrollo de grafenos dopados con nitrógeno*. Cd. Madero, México : Instituto Tecnológico de Cd. Madero.
- MAE. (19 de Enero de 2022). *Ministerio del Ambiente*. Obtenido de Normativa ambiental y sanitaria : http://www.upme.gob.mx/guia_ambiental/aceite/gestion/politica/normativ/normativ.htm
- Martín, C. K. (2019). Biocompatibility and Biodegradability of 2D Materials: Graphene and Beyond. *Chemical Communications*, 5540-5546.

- Martín, C., Kostarelos, K., & Prato, M. &. (2019). Biocompatibility and Biodegradability of 2D Materials: Graphene and Beyond. *Chemical Communications*, 5540–5546.
- Mendoza, A. G. (2017). *Biodegradación de petróleo diesel-2 en agua de mar por Pseudomonas aeruginosa en un biorreactor aireado y agitado*. 23-37: Sciéndo.
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. (2014). *Manual técnico para el manejo de aceites lubricantes usados de origen automotor e industrial*. Bogotá, Colombia : Organización de Control Ambiental y Desarrollo.
- Murillo, B. (2016). Diseño y construcción de un dispositivo para evaluar y caracterizar la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Tesis Maestría UAM-I*, 27-30.
- Nanda, S. P. (2018). Functionalization of Graphene Oxide and Its Biomedical Applications. *Acc Chem Res*, 291-315.
- Novoselov, K. S. (2004). *Electric field effect in atomically thin carbon films*. Moscow, Rusia: Science (UK and Russia).
- Ortiz Medina, O. (2007). *Evaluación de la gestión integral del manejo de aceite usado*. Bogotá, Colombia: Trabajo de Grado Maestría Gestión Ambiental, Pontificia.
- Pena-Benítez, I., & Rodríguez-González, V. &.-O. (2019). *Síntesis y caracterización de óxido de grafeno*. San Luis Potosí, México: Instituto Potosino de Investigación, Ciencia y Tecnología.
- Peralta-Otero, R. (2024). *Aislamiento y caracterización de bacterias marinas cultivables degradadoras de hidrocarburos del área de extracción y perforación de petróleo Lote Z-1, Tumbes- Perú*. Tumbes: Universidad Nacional de Tumbes.
- Polansky, R. P. (2017). Comparison of the mineral oil lifetime estimates obtained by differential scanning calorimetry, infrared spectroscopy, and dielectric dissipation factor measurements. *Thermochimica Acta*, 86-93.
- Prenafeta, F. (2016). Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard? *FEMS Microbial*, 103-110.

- Rich, J. H. (2002). Hydrogen isotopic composition of individual n-alkanes as an intrinsic tracer for bioremediation and source identification of petroleum contamination. *Environmental science and technology*, 724-728.
- Rodríguez, C. K. (2011). Propiedades y aplicaciones del grafeno. *Ingenierías*, 17-23.
- Rodríguez, I. (2018). *Tratamiento de purificación y acondicionamiento de grafeno para el desarrollo de aplicaciones*. Alicante, Venezuela: Universidad de Alicante.
- Rodríguez, V. (2018). *Synthesis and characterization of graphene*. Zaragoza, España: Escuela de Ingeniería y Arquitectura .
- Rosas, O. (2018). *Electrodos transparentes conductores basados en OG reducido para depósito electroquímico de óxidos semiconductores de interés fotovoltaico* . Altamira, México: Centro de investigación en materiales avanzados.
- Safdel, M. A. (2018). Microbial enhanced oil recovery, a critical review on worldwide implemented field trials in different countries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 159-172.
- Solanas, A. (2009). *Biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en la biorremediación de suelos*. Barcelona, España: Universidad de Barcelona, departamento de microbiología.
- Solís-Perez, R. (2022). *Óxido de grafeno químicamente modificado para bioaplicaciones*. Coruña: Universidad de Santiago Compostela.
- Soto, I., Hernández, R., Palacios, B., Jiménez, A., & Yee, I. (2018). *SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL GRAFENO, A PARTIR DEL MÉTODO DE HUMMERS Y REDUCCIÓN TÉRMICA CON ÁCIDO ASCÓRBICO*. Puebla, México: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Souto, G. C. (2004). Genetic and functional characterization of *Bacillus* spp. *Journal of Applied Microbiology*, 1247-1256.

- Srivastava, S. (2015). Bioremediation Technology: A Greener and Sustainable Approach for Restoration of Environmental Pollution. *Applied Environmental Biotechnology: Present Scenario and Future Trends*, 1-18.
- Tang, M. J. (2020). Denitrification performance of *Pseudomonas fluorescens* Z03 immobilized by graphene oxide-modified polyvinyl-alcohol and sodium alginate gel beads at low temperature. *National Library of Medicine*, 134-137.
- Torres-Landa, S. (2018). *OBTENCIÓN DE PELÍCULAS DELGADAS DE ÓXIDO DE GRAFENO POR MÉTODOS FISICOQUÍMICOS*. Morelos, México: Centro de Investigación en Ingeniería y Ciencias Aplicadas.
- Tovar, E. (2019). *Síntesis y Caracterización de Óxido de Grafeno reducido y dopado con N mediante un Proceso Solvotérmico*. San Luis Potosí, México : INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.
- Turcheniuk, K. H. (2018). lasmonic photothermal destruction of uropathogenic E-coli with reduced graphene oxide and core/shell nanocomposites of gold nanorods/reduced graphene oxide. *Journal of Materials Chemistry B*, 375-386.
- Urcuyo, R., González-Flores, D., & Cordero-Solano, K. (2021). Perspectivas y aplicaciones reales del grafeno después de 16 años de su descubrimiento. *Revista Colombiana de Química*, 20-36.
- Van Hamme, J. S. (2013). Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 503-549.
- Vargas, D. (2019). *Síntesis de óxido de grafeno reducido y aminado químicamente y su influencia en las propiedades eléctricas y mecánicas de nanocompósitos a base de caucho natural*. Santiago, Chile: Universidad De Chile.
- Villegas, L. (2014). Microbial Consortia, a Viable Alternative for Cleanup of Contaminated Soils. *Bioremediation in Latin America: Current Research and Perspectives.*, 235-148.
- Viera, M. R. (2015). *Aplicación de grafeno en recubrimientos antifouling*. Concepción, Chile: Congreso Internacional de Metalurgia y Materiales.

- Vivaldi, M. (2013). Bioremediation - An Overview. *Journal of Industrial Pollution Control*, 61-68.
- Vivaldi, M. (2013). Bioremediation an Overview. *Journal of Industrial Pollution Control.*, 161-168.
- Wang, D. W. (2013). Using graphene oxide to enhance the activity of anammox bacteria for nitrogen removal. *Bioresource Technology*, 527-530.
- Wauquier, J. (2017). *Motores térmicos y sus sistemas auxiliares*. Sevilla, España: Ediciones Díaz de Santos.
- Wolicka, D. &. (2018). Microorganisms and Crude Oil, Introduction to Enhanced Oil Recovery (EOR) . *Processes and Bioremediation of Oil-Contaminated Sites.* , 56-64.
- Yoon H. J., J. D. (2011). Carbon dioxide gas sensor using a graphene sheet. *Sensors and Actuators*, 310-313.
- Zawierucha, I. &. (2013). Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol. . *Bioaugmentation Biostimulation and Biocontrol , Soil Biology.*, 1-23.

NOM-128-SSA1-2021

En este presente apéndice se muestra la NOM-128-SSA1-2021, que corresponde a la norma de “SALUD AMBIENTAL, AGUA PARA USO Y CONSUMO HUMANO – LÍMITES PERMISIBLES DE CALIDAD DEL AGUA”

1. RECOLECCIÓN, CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRA

- Contenedores de muestras.

Botellas de vidrio ámbar con tapas con rosca de politetrafluoroetileno (PTFE). Se recomienda el uso de contenedores de muestras. Si se reutilizan contenedores de muestra deben de llevarse a cabo buenas prácticas de laboratorio para la limpieza. No deben utilizarse botellas tratadas a alta temperatura en un horno de mufla (400 °C y superiores) como procedimiento de limpieza. Los estudios existentes indican una tendencia a que las microcistinas y las nodularinas se adsorben en la superficie de la cristalería limpiada repetidamente por calentamiento en un horno de mufla

Antes del salir a coleccionar las muestras, debe agregarse tiosulfato de sodio a cada botella de muestra; para lo cual deberá colocar en el material de muestreo, previo a la esterilización 0.1 mL de solución de tiosulfato de sodio al 10% para neutralizar 120 mL de la muestra o bien 0.4 mL para 480 mL. El tiosulfato de sodio no debe de diluirse en agua al preparar las botellas para las muestras. El agente reductor debe añadirse a la botella vacía en forma sólida. En el campo, abra el grifo y deje que el sistema se descargue durante aproximadamente 5 minutos. Llenar cada botella, teniendo cuidado de no eliminar el tiosulfato de sodio, e invertir varias veces para mezclar la muestra con el agente reductor.

Colecte suficiente muestra para cumplir con los requisitos de este método. Para el tamaño de la muestra debe de considerarse un volumen suficiente para preparar las muestras de control de calidad y el volumen apropiado para el almacenamiento congelado.

No debe utilizarse ácido ascórbico para reducir el cloro en las muestras de agua de uso y consumo humano. Durante los estudios para evaluar la estabilidad de las microcistinas

durante el transporte y el almacenamiento, se ha descrito que éstas se degradan en presencia de ácido ascórbico.

La adición de tiosulfato de sodio no es necesaria para agua de uso y consumo humano antes del tratamiento (muestras colectadas antes de la entrada al sistema de tratamiento), sin embargo, puede añadirse si el laboratorio elige preparar un solo tipo de contenedor de muestra.

Las muestras deben ser refrigeradas durante el envío y no deben exceder los 10 °C durante las primeras 48 horas después de la recolección.

Se debe confirmar que las muestras están por debajo o igual a 10 °C cuando se reciben en el laboratorio. Una temperatura superior a 10 °C es aceptable en aquellos casos en los que el tiempo de traslado es corto y las muestras no tienen tiempo suficiente para alcanzar la temperatura mencionada. En este caso, deben revisarse las bolsas de hielo en las hieleras de transporte. Si éstas aún permanecen congeladas, las muestras pueden considerarse válidas. Las muestras deben de ser congeladas al llegar al laboratorio.

Para muestras de agua de uso y consumo humano que ha pasado a través de un sistema de tratamiento, debe analizarse una muestra de cada hielera de transporte utilizando ensayos comunes para determinar el cloro libre residual, por ejemplo, la técnica colorimétrica N, N-dietil-p-fenilendiamina (DPD). La concentración total de cloro debe ser menor que el límite de detección del ensayo. Se puede recoger una muestra duplicada para llevar a cabo el ensayo de cloro libre residual.

Para el almacenamiento en congelación, deben utilizarse botellas de vidrio de borosilicato, claras o ámbar, con tapas con empaques de PTFE. Seleccione la capacidad de la botella y el volumen de la muestra para evitar la ruptura de las botellas durante la congelación. Planee con anticipación para contar con suficiente volumen para preparar muestras de control de calidad como se requiere en este método.

Las muestras deben de ser analizadas lo antes posible. Las muestras que se colectan y almacenan deben analizarse dentro de los 14 días posteriores a la recolección. Este periodo de 14 días se estableció como un tiempo de retención seguro basado en la evidencia empírica: durante el desarrollo del método, se observó la degradación de microcistinas en dos matrices de agua potable después de tres semanas de almacenamiento en congelación.

Las muestras pueden filtrarse y analizarse en cualquier momento después de lisis, dentro de los 14 días posteriores a la recolección. Si no se analizan inmediatamente, las muestras lisadas pueden almacenarse mediante congelación en viales de vidrio con tapas con empaques de PTFE, por ejemplo, 1 ml de muestra lisada y filtrada contenida en un vial de 4 ml.

2. LÍMITES PERMISIBLES EN LA CALIDAD DEL AGUA

2.1 Límites permisibles de características físicas y organolépticas

Las características físicas y organolépticas deberán ajustarse a lo establecido en la Tabla 1

Tabla 1 Límites establecidos de características físicas y organolépticas

CARACTERÍSTICA	LÍMITE PERMISIBLE
COLOR	20 unidades de color verdadero en la escala de platino-cobalto.
OLOR Y SABOR	Agradable (se aceptarán aquellos que sean tolerables para la mayoría de los consumidores, siempre que no sean resultados de condiciones objetables desde el punto de vista biológico o químico).
TURBIEDAD	5 unidades de turbiedad nefelométricas (UTN) o su equivalente en otro método.

2.2 Límites permisibles de características químicas

El contenido de constituyentes químicos deberá ajustarse a lo establecido en la Tabla 2. Los límites se expresan en mg/l, excepto cuando se indique otra unidad.

Tabla 2 Límites establecidos de características químicas

CARACTERÍSTICA	LÍMITE PERMISIBLE
ALUMINIO	0.2
ARSÉNICO	0.05
BARIO	0.7
CADMIO	0.005
CIANUROS (COMO CN-)	0.07
COLOR RESIDUAL LIBRE	0.2-1.50
CLORUROS (COMO CL-)	250
COBRE	2
CROMO TOTAL	0.05
DUREZA TOTAL (COMO CaCO₃)	500
FENOLES O COMPUESTOS FENÓLICOS	0.001
FERRO	0.3
FLUORUROS (COMO F-)	1.5
MANGANESO	0.15
MERCURIO	0.001
NITRATOS (COMO N)	10
NITRITOS (COMO N)	0.05
NITRÓGENO AMONIACAL (COMO N)	0.5
PH (POTENCIAL DE HIDRÓGENO) EN UNIDADES DE PH	6.5-8.5

PLAGUICIDAS EN MICROGRAMOS/L: ALDRÍN Y DIELDRÍN (SEPARADOS O COMBINADOS)	0.03
CLORDANO (TOTAL DE ISÓMEROS)	0.03
CLORDANO (TOTAL DE ISÓMEROS)	0.3
DDT (TOTAL DE ISÓMEROS)	1
GAMMA-HCH (LINDANO)	2
HEXACLOROBENCENO	0.01
HEPTACLORO Y EPÓXIDO DE HEPTACLORO	0.03
METOXICLORO	20
2,4 - D	50
PLOMO	0.025
SODIO	200
SÓLIDOS DISUELTOS TOTALES	1000
SULFATOS (COMO SO₄=)	400
SUSTANCIAS ACTIVAS AL AZUL DE METILENO (SAAM)	0.5
TRIHALOMETANOS TOTALES	0.2
ZINC	5

NMX-AA-132-SCFI-2006

En este apéndice se presenta la NMX-AA-132-SCFI-2006, que es la norma “MUESTREO DE SUELOS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y LA CUANTIFICACIÓN DE METALES Y METALOIDES, Y MANEJO DE LA MUESTRA”

1. PLAN DE MUESTREO**1.1 Consideraciones generales**

El propósito del plan de muestreo es:

- a) Organizar y definir los procedimientos aplicables.
- b) Establecer las responsabilidades de los participantes.
- c) Describir la técnica de muestreo.
- d) Programar las actividades a realizar durante el muestreo, su duración, así como las herramientas y medidas de seguridad.
- e) Definir las medidas de aseguramiento de calidad de las etapas de los procesos de muestreo.

1.2 Consideraciones específicas

Un plan de muestreo debe contener al menos la siguiente información:

- a) El lugar y la fecha de elaboración.
- b) El nombre y la firma de los responsables de su elaboración.
- c) El tipo de muestreo que se va a desarrollar, el propósito del mismo y los parámetros a determinar.
- d) La localización del sitio, así como la delimitación y cuantificación de la superficie del área de muestreo. Se debe indicar en forma gráfica y/o escrita la localización geográfica y las vías de acceso al sitio.
- e) El diseño del muestreo.
- f) La justificación para la ubicación, los criterios utilizados y el método para la distribución de puntos de muestreo, selección del tipo de muestreo y registro de parámetros de campo.

- g) La ubicación y el número de puntos de muestreo
- h) Número de muestras
- i) Profundidad de las muestras.
- j) El procedimiento de muestreo, materiales, equipos de muestreo y seguridad, recipientes, etiquetas y registros de campo.
- k) La custodia de las muestras.
- l) El procedimiento de aseguramiento y control de calidad del muestreo.
- m) La descripción de actividades, responsables y tiempos de ejecución.
- n) Anexos que soporten el plan de muestreo.

2. TÉCNICAS DE MUESTREO

2.1 Material y equipo recomendado para la colecta de muestras

2.1.1 Especificaciones generales:

- a) Herramienta para la colecta de muestras de suelo en campo, fácil de limpiar, resistente al desgaste y que no contamine las muestras con impurezas.
- b) Envases con capacidad para contener al menos 500 g de muestra.
- c) Plumas, marcadores y etiquetas.
- d) Cinta métrica o flexómetro
- e) Cámara fotográfica.
- f) Libreta de campo.
- g) Plano, mapa o fotografía aérea de la zona de muestreo, con la ubicación tentativa de los puntos de muestreo.
- h) Instrumento que permita la ubicación de los puntos de muestreo.

2.1.2 Muestreo superficial

El muestreo se debe de realizar con una cuchara o espátula de acero inoxidable o plástico.

2.1.3 Muestreo vertical

El muestreo vertical se realiza a través de pozos que permitan obtener muestras para determinar el perfil del suelo a la profundidad proyectada. Para el muestreo vertical se pueden utilizar excavaciones, que permitan el acceso de la persona que toma la muestra, o se pueden utilizar perforaciones para el hincado de un muestreador manual o mecánico que obtenga un núcleo que permita muestrear el perfil del suelo. Se debe tener precaución de utilizar perforadoras en buen estado que no provoquen contaminación.

2.2 Consideraciones para la toma de las muestras de suelo.

2.2.1 Se debe garantizar que la muestra obtenida sea de un tamaño tal que una vez tamizada contenga por lo menos 250 g de residuo fino para su análisis y que facilite y permita, la preparación de muestras compuestas en el muestreo de detalle.

2.2.2 Se debe evitar que el equipo de muestreo provoque contaminación entre las diferentes muestras, para lo cual se deberá limpiar con una brocha o cepillo. En caso de que la limpieza no sea suficiente, será necesario lavar con agua, entre muestra y muestra, el equipo y los instrumentos de muestreo. Cuando se utilicen detergentes, éstos deben estar libres de fosfatos.

2.2.3 En el muestreo vertical, deben identificarse los diferentes horizontes que forman el suelo en función de su aspecto físico (color, textura, grado de compactación, entre otros). Para horizontes con espesor menor a 30 cm, debe tomarse una muestra de canal vertical abarcando todo el espesor del mismo. Para horizontes mayores a 30 cm deben tomarse tantas muestras de 30 cm como sean necesarias para cubrir el espesor total. Para profundidades mayores a 2 m el intervalo de muestreo deberá ser definido con su justificación correspondiente.

2.2.4 En el muestreo de detalle, cada muestra compuesta se constituye con cinco muestras simples tomadas en tresbolillo (ver figura 1) distribuidas uniformemente. El proceso de homogeneización se puede desarrollar en campo asegurando que las muestras simples tengan masa o volumen similares. El

homogeneizado puede lograrse utilizando bolsas de polietileno, haciendo girar la muestra en todas direcciones.

2.2.5 En caso de presencia de restos de plantas, se deben retirar antes del muestreo, salvo que se consideren importantes para el caso en estudio.

2.2.6 En caso de presencia de piedras mayores de 2 cm de diámetro (aproximadamente), éstas deben ser retiradas.

2.2.7 Se deben tomar fotografías del sitio y de los puntos de muestreo, los cuales deben estar claramente referenciados.

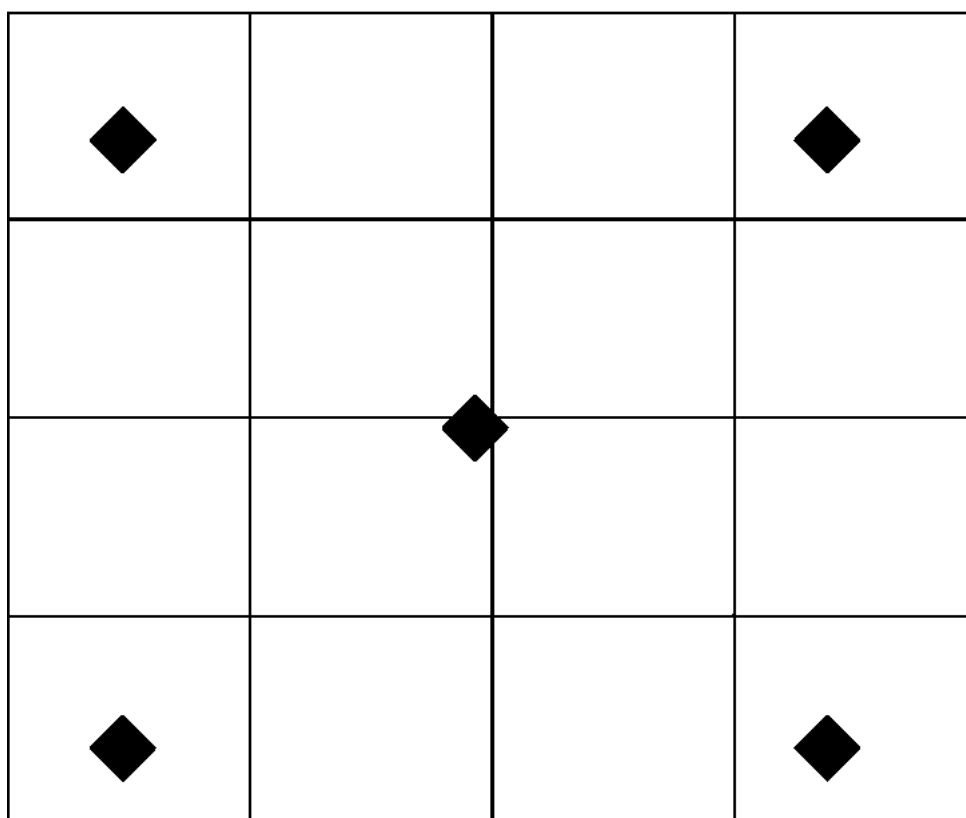


Figura 1 Esquema de distribución en tresbolillo de los incrementos a tomar para la formación de una muestra compuesta.

3. MANEJO Y CONTROL DE MUESTRAS

3.1 Envasado y etiquetado de las muestras.

3.1.1 obtener las muestras de suelo, se debe registrar toda la información de muestreo en la libreta de campo.

3.1.2 Las muestras deben ser envasadas y etiquetadas conforme a las siguientes especificaciones:

- a) El envase debe ser cerrado de manera hermética garantizando su inviolabilidad hasta su llegada al laboratorio.
- b) El etiquetado de los recipientes debe realizarse inmediatamente después de recolectar cada una de las muestras.
- c) La etiqueta debe colocarse en un lugar visible y no sobrepasar las dimensiones del recipiente.
- d) La etiqueta que acompañe a la muestra debe incluir por lo menos su clave de identificación, lugar del muestreo o proyecto, y la fecha y hora del muestreo, así como las iniciales de la persona que toma la muestra.

3.1.3 Una vez envasadas y etiquetadas, las muestras deben ser llevadas al laboratorio en donde serán preparadas conforme a la naturaleza de los metales y metaloides a identificar y cuantificar, y sometidas a los procesos de análisis correspondientes.

2.3 Traslado de las muestras y cadena de custodia

- a) Durante el traslado es necesario evitar el efecto de factores externos que puedan cambiar la naturaleza de las muestras (por ejemplo, la temperatura y los rayos ultravioleta).
- b) La cadena de custodia en original y dos copias debe acompañar a las muestras desde su toma, durante su traslado y hasta el ingreso al laboratorio. El laboratorio debe incluir una copia de esta cadena con los resultados del análisis.

2.4 La cadena de custodia debe contener, al menos:

- a) El nombre de la empresa y responsable del muestreo.
- b) Los datos de identificación del sitio.
- c) La fecha del muestreo.
- d) Las claves de las muestras.
- e) Nombre del laboratorio que recibe las muestras.

- f) Los análisis o la determinación requerida.
- g) El número de envases.
- h) Observaciones.
- i) La identificación de las personas que participan en las operaciones de entrega y recepción en cada una de las etapas de transporte, incluyendo fecha, hora y firma de los participantes.

2.5 Libreta de campo

Toda la información concerniente al muestreo en campo deberá ser anotada con tinta indeleble, en una libreta de campo foliada. Los datos que deben anotarse en la libreta de campo, al momento del muestreo, son:

- a) El nombre de la persona que realizó el muestreo.
- b) Los datos de ubicación del sitio.
- c) La clave de identificación de cada una de las muestras tomadas y el punto de muestreo correspondiente.
- d) La ubicación de los puntos de muestreo.
- e) La fecha y hora de recolección de cada muestra.
- f) Las observaciones de campo al momento del muestreo, tales como:

Características del sitio:

- Condiciones climáticas
- Presencia de vegetación
- Uso actual del suelo
- Edificaciones e infraestructura
- Actividades ajenas al proceso propio de contaminación que pudieran influir en la calidad del muestreo
- Presencia de residuos o materiales de relleno.

Características del suelo:

- Textura
- Color
- Presencia de humedad
- Presencia de hojarasca

- Presencia de otros materiales eliminados durante el muestreo

Resultados de otras mediciones hechas en campo.

3.7 Condiciones de seguridad

Con el objeto de garantizar la seguridad y salud de los trabajadores, las muestras deberán ser tomadas considerando las regulaciones en materia de seguridad e higiene en el trabajo.

4. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO

4.1 Consideraciones Generales

La preparación de las muestras es tan importante como el muestreo y análisis de las mismas. Se describe la metodología para la preparación de las muestras de suelo antes de su ingreso al proceso analítico, o de su almacenamiento.

- 4.1.1 La preparación de las muestras de suelo incluye la recepción, registro, secado, cribado, homogeneizado y cuarteo, y el almacenamiento para su conservación.
- 4.1.2 Deberá de evitarse en todo momento la contaminación de las muestras.
- 4.1.3 Debido a que los elementos a estudiar se pueden encontrar a muy bajas concentraciones, el riesgo de contaminar con los diferentes dispositivos para preparar la muestra es relativamente alto. Por lo que se debe evitar el uso de material metálico en mal estado o deteriorado, así como el que contiene pintura como protección, dado que pueden ser fuente de contaminación con zinc, cadmio o plomo.
- 4.1.4 Las muestras deben ser envasadas para su uso o almacenamiento.

4.2 Material y equipo recomendado

- a) Mazo o rodillo de madera.
- b) Charolas de acero inoxidable o aluminio.
- c) Tamices de acero inoxidable de malla de 2 mm (10) y de 9,51 mm.
- d) Bitácora de laboratorio y libro de registro.
- e) Horno de secado con circulación constante de aire caliente y extractor.
- f) Envases.

- g) Etiquetas.
- h) Brochas y espátulas.

4.3 Procedimiento de preparación de muestras

4.3.1 Recepción y registro

- a) Al llegar las muestras al laboratorio deben registrarse con la clave de identificación de campo indicada en la etiqueta y la lista de las determinaciones requeridas señaladas en la cadena de custodia.
- b) El laboratorio puede asignar un número de registro a cada muestra, que conviene se realice con números seriados, para facilidad del manejo interno. Este registro debe estar correlacionado con la clave de identificación de campo.

4.3.2 Secado

- a) El secado se realiza con el propósito de facilitar el manejo de las muestras, mejorar la homogeneización y disminuir los cambios químicos indeseables.
- b) Las muestras de suelo se secarán de preferencia al ambiente. El secado debe realizarse extendiendo las muestras de suelo en las charolas.
- c) Las muestras deben extenderse sobre la charola logrando una profundidad inferior a 2,5 cm, colocarse a la sombra a una temperatura no mayor a 35°C y una humedad relativa entre 30 y 70%. Cuando por condiciones ambientales se requiera, se pueden secar en un horno a una temperatura no mayor de 35°C.

4.3.3 Cribado

- a) Una vez secadas las muestras y antes de disgregarlas, deben retirarse las piedras y los restos de plantas, a menos que la cadena de custodia indique que éstas últimas deban ser preservadas.
- b) La disgregación de las muestras, puede realizarse manualmente con un mazo o rodillo de madera, o mecánicamente con un equipo diseñado para tal efecto. Se prohíbe el uso de molinos que pueda variar la textura original de las muestras.
- c) Una vez disgregadas las muestras deben ser cribadas en una malla de 9,51 mm y posteriormente por una de 2 mm de diámetro (malla 10) de acero inoxidable. La parte

de la muestra que logra pasar ambas mallas es la que tiene el grado de fineza conveniente para la mayoría de los análisis requeridos, para cuantificar las sustancias buscadas.

- d) Se descarta el material grueso retenido en cada una de las mallas.
- e) La cantidad del suelo tamizado, finos, debe ser suficiente para realizar las determinaciones analíticas requeridas.

4.3.4 Homogeneizado y cuarteo

Este paso es necesario para asegurar que la cantidad de muestra que se analiza representa la composición de la cantidad total de los finos del suelo una vez tamizado en el laboratorio, para lo cual se deben utilizar los métodos de cuarteo adecuados al método analítico que se aplique.

4.3.5 Almacenamiento de los finos de las muestras

- a) Una porción de las muestras analizadas debe almacenarse para posteriores comprobaciones u otros usos. Para ello pueden ser utilizados los envases originales debidamente cerrados, con el fin de disminuir los cambios químicos.
- b) Estas muestras deben permanecer cerradas y debidamente identificadas. Para esto se recomienda conservar el número de registro del laboratorio, junto con la etiqueta de campo.
- c) La muestra almacenada puede sufrir cambios lo cual debe tenerse presente en usos posteriores. En todo caso, es conveniente especificar si los resultados analíticos provienen de muestras recientes o con cierto tiempo de almacenamiento.
- d) El tiempo entre la toma de la muestra y el análisis no debe exceder de un mes.

5. Límites permisibles en la calidad del suelo

Tabla 1 Interpretación de resultados de materia orgánica

Clase	Materia orgánica (%)	
	Suelos volcánicos	Suelos no volcánicos
Muy bajo	< 4.0	< 0.5
Bajo	4.1 - 6.0	0.6 - 1.5
Medio	6.1 - 10.9	1.6 - 3.5
Alto	11.0 - 16.0	3.6 - 6.0
Muy Alto	> 16.1	> 6.0

Tabla 2 Interpretación de conductividad eléctrica

CE dS m ⁻¹ a 25°C	Efectos
< 1.0	Efectos despreciables de la salinidad
1.1 - 2.0	Muy ligeramente salino
2.1 - 4.0	Moderadamente salino
4.1 - 8.0	Suelo salino
8.1 - 16.0	Fuertemente salino
> 16.0	Muy fuertemente salino

Tabla 3 Interpretación de resultados de pH

Clasificación	pH
Fuertemente ácido	< 5.0
Moderadamente ácido	5.1-6.5
Neutro	6.6-7.3
Medianamente alcalino	7.4-8.5
Fuertemente alcalino	> 8.5

Tabla 4 Interpretación de resultados de materia orgánica

Clase	Materia orgánica (%)	
	Suelos volcánicos	Suelos no volcánicos
Muy bajo	< 4.0	< 0.5
Bajo	4.1 - 6.0	0.6 - 1.5
Medio	6.1 - 10.9	1.6 - 3.5
Alto	11.0 - 16.0	3.6 - 6.0
Muy Alto	> 16.1	> 6.0

Tabla 5 Interpretación de resultados de densidad

Tipos de suelos		g/cm ³	
Orgánicos y volcánicos		Menor de 1.00	
Minerales			
	Arcillosos	1.0	1.19
	Francosos	1.20	1.32
	Arenosos	Mayor a 1.32	

RESULTADOS DE CARACTERIZACIÓN DE SUELO

Este apéndice presenta las características del agua y suelo evaluadas en este estudio, conforme a las normas oficiales. Las pruebas realizadas para el suelo se basaron en la norma NMX-AA-132-SCFI-2006, que especifica los procedimientos y límites permisibles para la calidad del suelo. Para el análisis de las características del agua, se siguieron los lineamientos de la norma NOM-128-SSA1-2021.

- SUELO

Tabla 1 Resultados de las pruebas de caracterización de suelo

PRUEBAS	RESULTADOS
Densidad aparente	0.937 g/mL
Densidad real	0.45 g/mL
pH	6.78 mol/L
Conductividad	1.03 μ S/cm
Textura	Arcillosa
Materia orgánica	34.45%

- AGUA

Tabla 2 Resultados de las pruebas de caracterización de agua

PRUEBAS	RESULTADOS
Temperatura	26.7°C
Conductividad	1064 μ S
pH	6.5
Turbidez	1 UTN
Color	Incoloro
Olor	Inoloro

DIAGRAMAS DE ESPECTROSCOPIA FOTOELECTRÓNICA DE RAYOS X (XPS)

Los diagramas de XPS fueron tomadas del manual "Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy", Este manual se utiliza como referencia para la identificación e interpretación de datos de espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS).

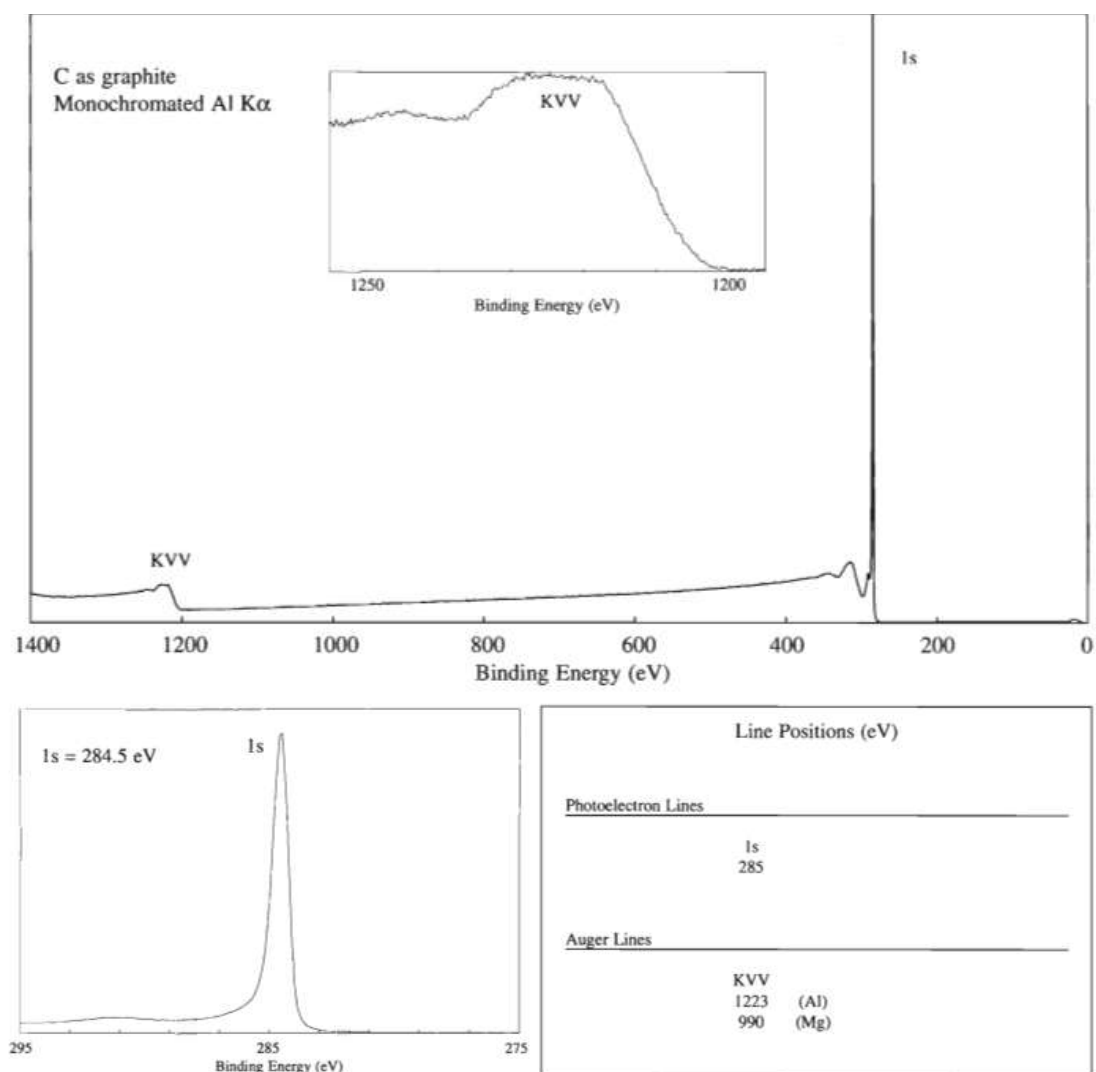


Figura 1 Espectro XPS para el carbono

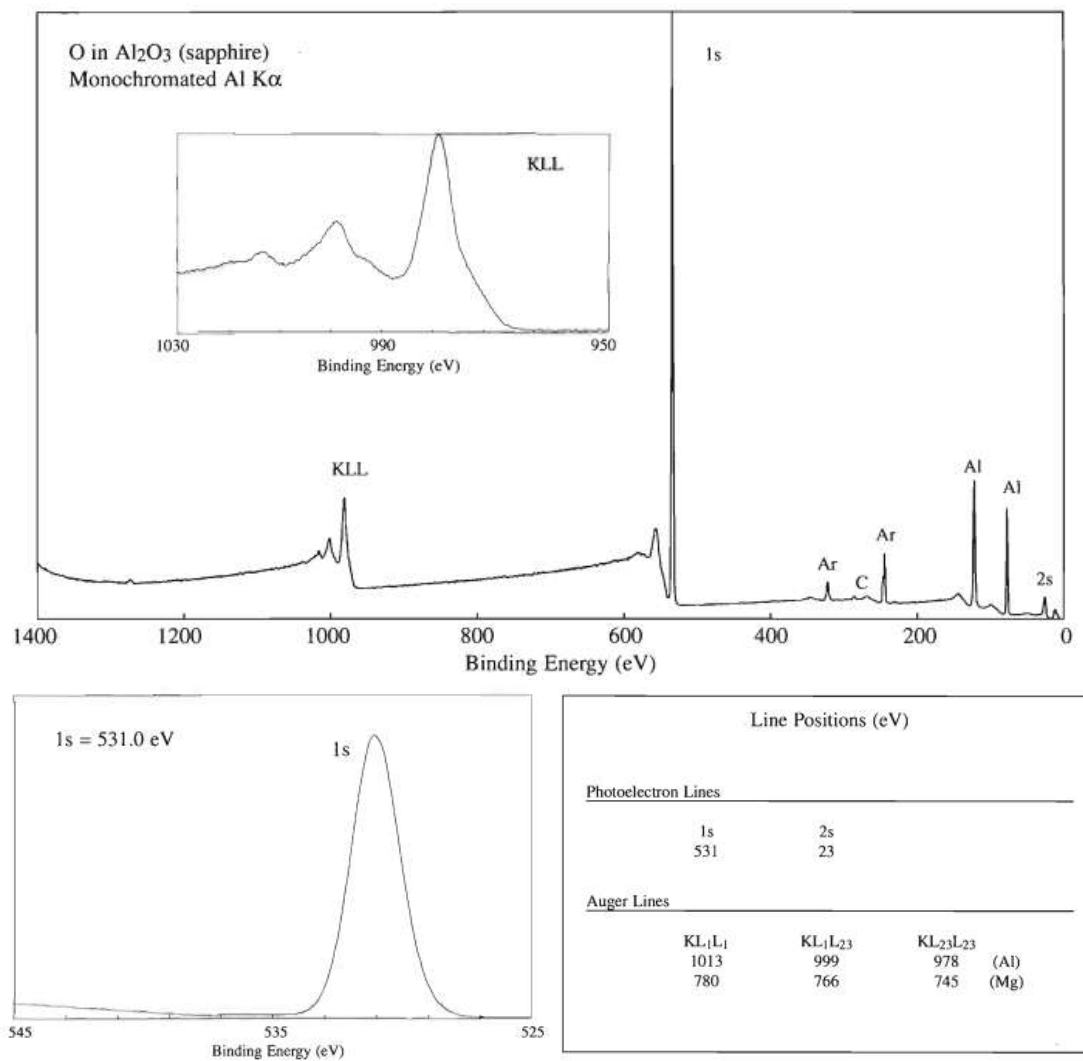


Figura 2 Espectro XPS para el oxígeno

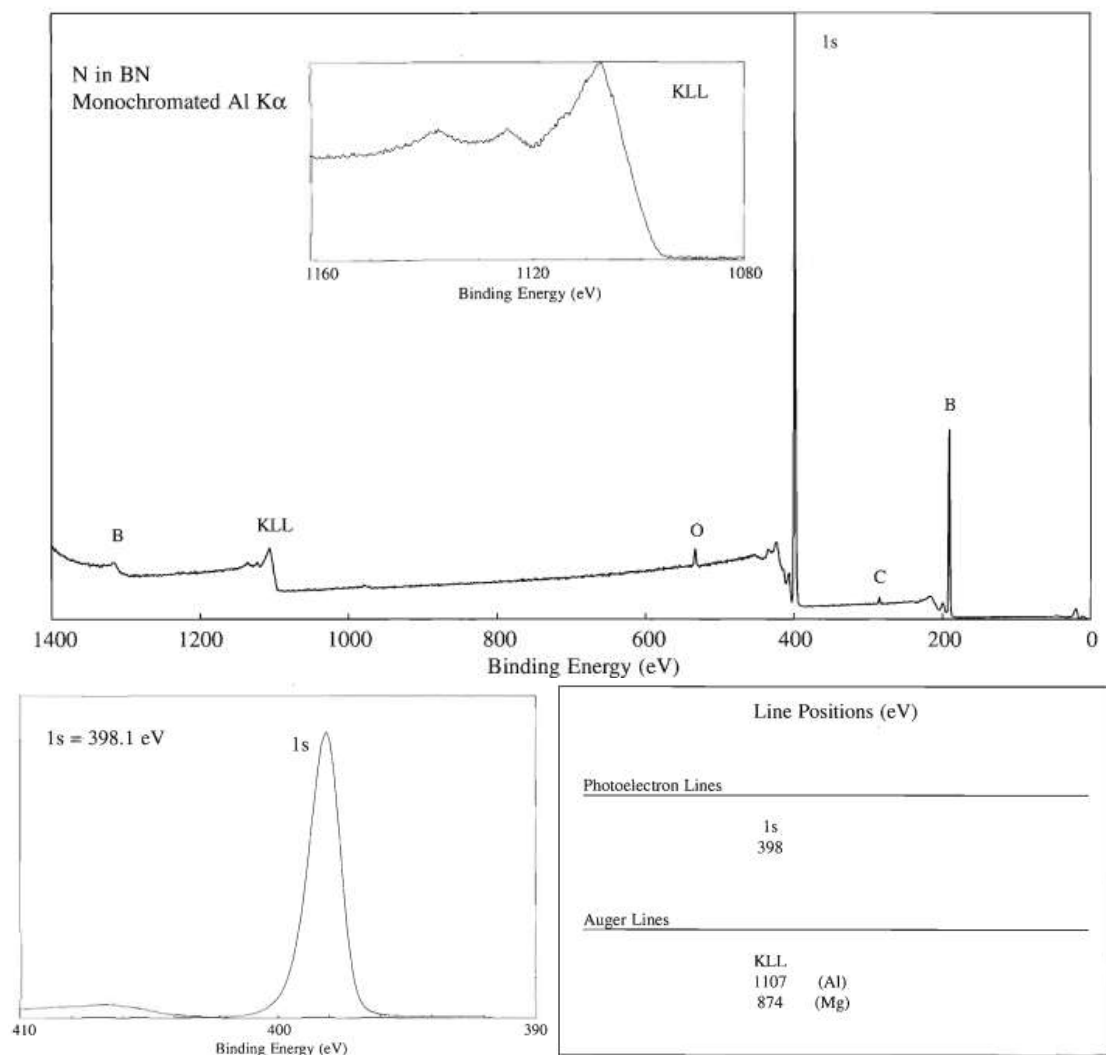


Figura 3 Espectro XPS para el nitrógeno

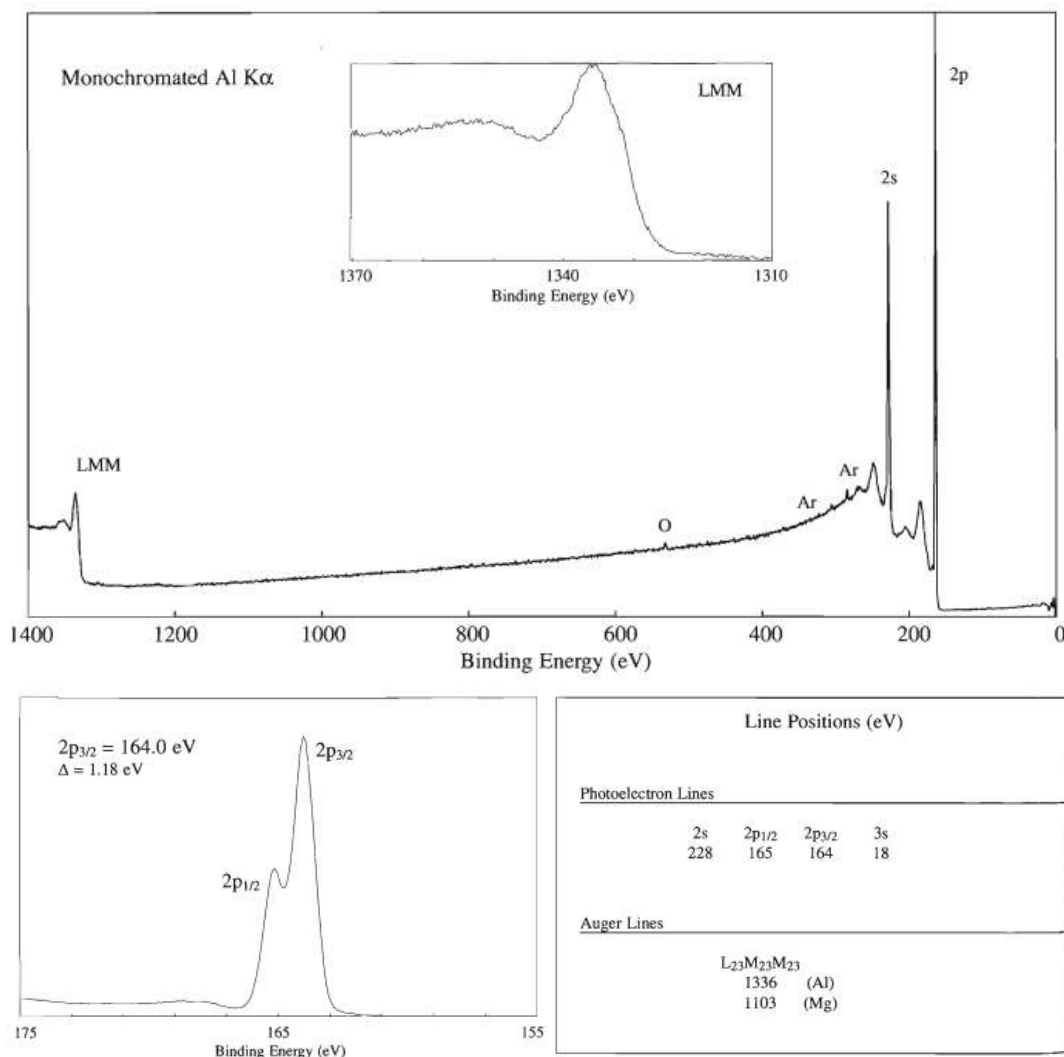


Figura 4 Espectro XPS para el azufre



Identificación de reporte de similitud: oid:3117:379690085

NOMBRE DEL TRABAJO

Efecto de la funcionalización con nitrógeno de la superficie del grafeno como promotor del crecimiento

AUTOR

Alitzel Solís Rodríguez

RECuento DE PALABRAS

38373 Words

RECuento DE CARACTERES

211347 Characters

RECuento DE PÁGINAS

170 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

4.2MB

FECHA DE ENTREGA

Sep 9, 2024 1:38 PM CST

FECHA DEL INFORME

Sep 9, 2024 1:41 PM CST**● 38% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 37% Base de datos de Internet
- 8% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de Crossref
- Base de datos de contenido publicado de Crossref
- 0% Base de datos de trabajos entregados

Resumen

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA	
Título del trabajo	EFECTO DE LA FUNCIONALIZACIÓN CON NITRÓGENO DE LA SUPERFICIE DELGRAFENO COMO PROMOTOR DEL CRECIMIENTO DE BACTERIAS CAPACES DE DEGRADAR HIDROCARBUROS	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	ALITZEL SOLÍS RODRÍGUEZ	2220334f@umich.mx
Director	JOSÉ RICARDO RANGEL SEGURA	rrangel@umich.mx
Codirector	VERÓNICA JANETTE CEDEÑO GARCIDUEÑAS	veronica.cg@vmorelia.tecnm.mx
Coordinador del programa	MA. CARMEN CHAVÉZ PARGA	cparga@umich.mx

Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	NO	

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	SI	CORROBORAR QUE LA ESCRITURA A ALGUNOS TÉRMINOS FUERA CORRECTA
Traducción a otra lengua	NO	
Revisión y corrección de estilo	NO	
Análisis de datos	NO	
Búsqueda y organización de información	NO	
Formateo de las referencias bibliográficas	NO	
Generación de contenido multimedia	NO	
Otro	NO	

Datos del solicitante	
Nombre y firma	ALITZEL SOLÍS RODRÍGUEZ
Lugar y fecha	MORELIA, MICHOACÁN A 11 DE SEPTIEMBRE DEL 2024