

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

C. B. S.

**“DEGRADACIÓN DE METIL TER-BUTIL ÉTER (MTBE):
ASPECTOS CINÉTICOS Y CONDICIONES DE CO-METABOLISMO”**

T E S I S

**Que para obtener el grado de
Maestro en Biotecnología**

P R E S E N T A

MIGUEL MAGAÑA REYES

Julio/ 2001

“El Postgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana esta incluido en el Padrón de Postgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio 471-0/Maestría en Biotecnología.”

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la
comunicación de resultados que presentó:

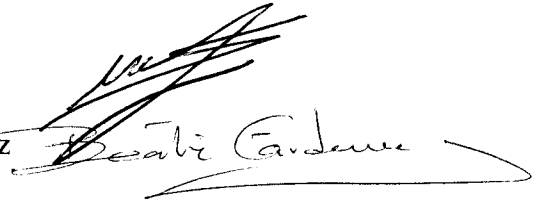
MIGUEL MAGAÑA REYES

El día 23 de Julio del año de 2001

Comité Tutorial:

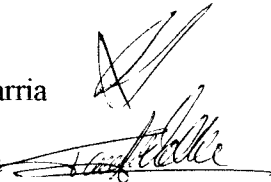
Tutor: Dr. Sergio Revah Moiseev.

Asesor: Dra. Beatriz Cárdenas González



Sinodal: Dra. Marcia Guadalupe Morales Ibarria

Sinodal: Dra. Tania Lorena Volke Sepúlveda



A mis Padres:

Miguel Eugenio y María Guadalupe

Por todo su Amor, apoyo, comprensión y confianza.

A mis hermanos:

Guadalupe, Verónica y Alejandro

Por su apoyo incondicional y el cariño que me han brindado

A mi hermano Hodín:

Por alentarme entre otras cosas a realizar esta maestría.

A Adriana:

Por su Amor y confianza.

Agradecimientos

A:

Dr. Sergio Revah
Dra. Ma. Elena Acuña

Por todo el apoyo recibido durante la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
Al Instituto Mexicano del Petróleo (IMP)
A la Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA)
A la Organización de Estados Americanos (OEA)

Por el apoyo económico otorgado para la realización de este trabajo

Al H. Jurado:

Dra. Beatriz Cárdenas González, Dra. Marcia Morales Ibarria, Dra. Tania Volke Sepúlveda
Por sus comentarios.

A la Universidad Autónoma Metropolitana

AL Dr. Richard Auria, a la Maestra Rosa O. González y al Dr. Alberto Castillo, así como a todos mis compañeros y amigos: Eduardo González, Marisol Vásquez, Sergio Hernández, Irmene Ortiz, Inés García. A Claudia Castillo.

RESUMEN

RESUMEN.

Las enmiendas de la Ley de Aire Limpio (Clean Air Act Amendments, CAAA) de los Estados Unidos, requirieron en 1990 el uso de sustancias oxigenantes en las gasolinas para reducir ciertas emisiones durante su combustión. En México se sustituyó el tetraetilo de plomo por MTBE (9% en vol.) en 1993 en la gasolina Magna SIN. Desde 1996, el MTBE fue detectado en suministros de agua potable, proporcionándole un sabor y olor desagradables. California anunció el retiro gradual del uso de MTBE en gasolina para el 31 de diciembre del 2002. México no planea eliminar el uso de MTBE en sus gasolinas, de hecho PEMEX ha construido plantas para la producción de oxigenantes en Tula, Salamanca, Cadereyta y Salinacruz. El MTBE provoca enfermedades respiratorias y neurológicas y se considera como un posible carcinógeno. Lo anterior aunado a su fácilmente dispersión en el aire, agua y suelo, convierten al MTBE en una sustancia riesgosa. Existen relativamente pocos reportes de la biotransformación del MTBE en la naturaleza, en comparación con los demás compuestos de la gasolina. En consecuencia es necesario encontrar microorganismos capaces de biodegradar este compuesto y estudiar los mecanismos de éste fenómeno, lo cual ayudaría a plantear estrategias de biorremediación de sitios contaminados con ésta sustancia. En el presente trabajo se reporta la obtención de consorcios microbianos y de cepas bacterianas capaces de degradar al MTBE mediante cometabolismo: la biodegradación de una sustancia en la presencia obligada de un sustrato de crecimiento. Se realizaron estudios de degradación aerobia a nivel de laboratorio mediante la técnica de microcosmos (Garnier y col. 2000). Como sustratos se estudiaron la gasolina Magna SIN (como mezcla de múltiples sustratos potenciales), y algunos análogos estructurales a la molécula del MTBE: dietil éter, los alcoholes isobutílico, secbutílico, isoamílico y terbutílico, éste último reportado como un intermediario metabólico del MTBE (Hardison y col. 1997, Steffan y col. 1997). Como compuesto de referencia se empleó pentano, un hidrocarburo de fácil asimilación por los microorganismos estudiados. Los resultados encontrados muestran que ninguno de los microorganismos estudiados fue capaz de utilizar al MTBE como único sustrato de crecimiento; sin embargo se logró la degradación del oxigenante por cometabolismo. Con consorcios se obtuvo la degradación del MTBE presente en la gasolina Magna SIN, logrando velocidades máximas de degradación de MTBE de 0.02 mg /mg proteína·h y porcentajes de degradación superiores al 95%. Se logró además la degradación cometabólica del MTBE en presencia de pentano (velocidad máxima de 0.038 mg/ mg proteína·h con una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* CDBB-B-1230 (Garnier y col. 1999), de isobutanol (velocidad máx. de 0.009 mg/ mg proteína·h) y de dietil éter (0.019 mg/ mg proteína·h) aunque sólo se logró cometabolismo de MTBE con éste último compuesto con un consorcio. No se obtuvo cometabolismo con los alcoholes terbutílico, isoamílico y secbutílico.

ABSTRACT

ABSTRACT.

Clean Air Act Amendments, CAAA of the United States, required in 1990 the use of oxygenates substances in gasolines in order to reduce certain emissions during the combustion. In Mexico lead tetraethyl was substituted by MTBE (9% in vol.) since 1993 in the gasoline Magna SIN. California announced the gradual retirement of the use of MTBE in gasoline for December 31 the 2002. Mexico doesn't plan to eliminate the use of MTBE in its gasolines, in fact PEMEX has built plants for the oxygenates production in Tula, Salamanca, Cadereyta and Salinacruz. The MTBE causes breathing and neurological illnesses and it is considered as a possible carcinogen. The above-mentioned facts and its easy dispersion in the air, water and soils, become the MTBE into a risky substance. In the literature only few reports about the biotransformation of the MTBE exist in comparison with the other compounds of the gasoline. In consequence it is necessary to find microorganisms capable of biodegrade this compound and to study the mechanisms of this phenomenon, this would help to outline strategies of biorremediation of polluted places with this substance. In the present work, microbial consortia and bacterial strains were find to be able to degrade the MTBE by cometabolism. The experiments were carried out in aerobic conditions at laboratory level by the microcosms technique (Garnier et al., 2000). As growth substrates different substances were studied. The gasoline Magna SIN (like mixture of multiple potential substrates), and some compounds with similar molecules to the molecule of MTBE : diethyl ether, some alcohols: isobutyl, secbutyl, isoamyl and terbutyl alcohols, (the last one reported as a metabolic intermediate of the MTBE degradation). (Hardison et al. 1997, Steffan et al. 1997). As a reference compound, pentane, a hydrocarbon of easy assimilation for the studied microorganisms was used. The results show that none of the studied microorganisms could able to use the MTBE as the only substrate of growth; however the degradation of the oxygenate was achieved by cometabolism. With the consortia, the degradation of the MTBE present in the gasoline, the maximum rates of degradation were 0.02 mg /mg protein·h and degradation of 95%. MTBE Cometabolic degradation was achieved in the presence of pentane (maximum rate of 0.038 mg / mg protein·h with a strain of *Pseudomonas aeruginosa* CDBB-B-1230 (Garnier et al. 1999), of isobutyl alcohol (max. rate of 0.009 mg / mg protein·h) and of diethyl ether (0.019 mg / mg protein·h) although MTBE cometabolism was only achieved with the last one only with the consortium. Cometabolism with terbutyl, isoamyl and secbutyl alcohols was not obtained.

INDICE

1. Introducción	1
1.1 Características del MTBE	6
1.2 Exposición al MTBE	6
1.3 Efectos a la salud	10
1.4 Transformación del MTBE	11
1.4.1 Biodegradación gratuita	12
1.4.2 Cometabolismo	13
1.5 Control de la contaminación por MTBE	14
1.5.1 Extracción de vapores del suelo	15
1.5.2 Desorción térmica a bajas temperaturas	16
1.5.3 Adsorción con carbón activado granular	16
1.5.4 Arrastre con aire o venteo	17
1.5.5 Extracción con aire	17
1.5.6 Bioventeo	17
1.5.7 Oxidación con peróxido de hidrógeno	18
1.5.8 Biofiltración	18
2. Estado del arte	19
2.1 Degradación anaerobia	21
2.2 Degradación aerobia	22
3. Objetivos	33
4. Materiales y métodos	37
4.1 Inóculos	39
4.2 Reactivos	40
4.3 Cuantificación de Biomasa	40
4.4 Medio de cultivo	41
4.5 Microcosmos	41
4.6 Análisis cromatográfico	42
4.7 Curvas estándar	45
4.8 Análisis de regresión de los datos experimentales	46
4.9 Coeficiente cometabólico	46
5. Resultados y discusiones	47
5.1 Degradación de MTBE por consorcios	49
5.1.1 Degradación como única fuente de carbono	49
5.1.2 Cinéticas de degradación de MTBE por los consorcios con gasolina	49
5.2 Degradación cometabólica de MTBE por cepas puras	59

5.2.1 Aislamiento de las cepas puras del consorcio P	59
5.2.2 Cinéticas de degradación con cepas puras	59
5.3 Estudios de degradación cometabólica de MTBE con diferentes sustratos	63
5.3.1 Microorganismos	63
5.3.2 Sustratos	63
5.3.3 Enriquecimiento de los cultivos	63
5.3.4 Cinéticas de degradación	64
5.3.4.1 MTBE y los alcoholes secbutílico, ter-butílico (TBA) e isoamílico	64
5.3.4.2 Cinéticas con pentano	65
5.3.4.3 Cinéticas con isobutanol	69
5.3.4.4 Cinéticas con dietil éter	71
5.3.4.5 Resumen de los datos cinéticos	74
6. Conclusiones	77
6.1 Degradación cometabólica de MTBE por consorcios	79
6.2 Degradación cometabólica de MTBE por cepas puras	79
6.3 Estudios de degradación cometabólica de MTBE con diferentes sustratos	80
Recomendaciones	81
Apéndice A	85
A.1 El modelo de Gompertz	87
A.2 Cálculo de la velocidad máxima de consumo de sustrato De la ecuación de Gompertz	88
A.3 Experimentos con adiciones sucesivas de sustratos	91
Bibliografía	93

FIGURAS

Figura 1.1	Composición de la gasolina mexicana Magna SIN (Celestinos, 1995).	5
Figura 1.2	Visión general de estrategias de remediación (Yang y col. 1998).	15
Figura 2.1	Vía propuesta para la degradación cometabólica de MTBE por <i>Graphium sp.</i> (Hardison y col. 1997).	24
Figura 2.2	Vía de degradación de MTBE por bacterias propano-Oxidantes. (Steffan y col. 1997).	26
Figura 4.1	Estructura molecular del MTBE y algunos análogos utilizados en los experimentos de cometabolismo.	42
Figura 4.2	Microcosmos en botellas serológicas de 125 mL.	43

TABLAS

Tabla 1.1	Productores de MTBE de EE.UU.	7
Tabla 1.2	Identidad química y propiedades químicas/físicas de oxigenantes de gasolina.	8
Tabla 4.1	Medio de sales minerales (MSM).	41
Tabla 5.1	Datos cinéticos de degradación de gasolina Magna SIN.	56
Tabla 5.2	Datos cinéticos de degradación de gasolina Magna SIN con adición exógena de MTBE.	59
Tabla 5.3	Datos cinéticos de degradación de una mezcla de pentano y MTBE por cepas puras.	62
Tabla 5.4	Velocidad máxima de consumo de sustrato .	74
Tabla 5.5	Velocidad máxima de degradación cometabólica de MTBE.	75

GRÁFICAS

Gráfica 5.1	Degradación de gasolina Magna SIN y MTBE por el consorcio P.	50
Gráfica 5.2	Consumo de MTBE y gasolina por el consorcio P. Datos transformados para su análisis por el modelo de Gompertz.	51
Gráfica 5.3	Consumo de gasolina y MTBE. Datos experimentales y ajustados.	52
Gráfica 5.4	Datos experimentales y ajustados de la degradación de gasolina comercial Magna SIN y del MTBE por el consorcio P.	53

Gráfica 5.5	Evolución de la concentración de MTBE como único sustrato de crecimiento para los consorcios estudiados.	54
Gráfica 5.6	Degradación de vapores de gasolina Magna SIN por 4 consorcios bacterianos.	55
Gráfica 5.7	Degradación cometabólica de MTBE con gasolina Magna SIN por los consorcios estudiados.	55
Gráfica 5.8	Degradación de gasolina Magna SIN adicionada con MTBE exógeno.	57
Gráfica 5.9	Degradación cometabólica de MTBE. Efecto del incremento de la concentración del oxigenante.	57
Gráfica 5.10	Cinética de degradación cometabólica de MTBE con pentano por las cepas V y IX.	60
Gráfica 5.11	Degradación cometabólica de MTBE con pentano con las cepas IV y VIII.	61
Gráfica 5.12	Degradación de MTBE como única fuente de carbono y energía.	64
Gráfica 5.13	Consumo de pentano por la cepa Ps y por el consorcio G.	66
Gráfica 5.14	Consumo de oxígeno y formación de bióxido de carbono por la cepa Ps y el consorcio G.	66
Gráfica 5.15	Microcosmos alimentados con pentano y MTBE.	67
Gráfica 5.16	Cinéticas de consumo de pentano por las cepas CDBB-B-999 y CDBB-B-1230.	68
Gráfica 5.17	Cinéticas de degradación cometabólica de MTBE y consumo de pentano por las cepas CDBB-B-999 y CDBB-B-1230.	69
Gráfica 5.18	Degradación cometabólica de MTBE en presencia de isobutanol.	70
Gráfica 5.19	Experimento de degradación de DEE.	71
Gráfica 5.20	Cometabolismo de MTBE en presencia de DEE.	72
Gráfica 5.21	Asimilación de DEE en presencia de MTBE.	73
Gráfica 5.22	Consumo de oxígeno y formación de bióxido de carbono durante la degradación de DEE.	73
Gráfica A.1	Modelo de Gompertz. Ejemplo hipotético.	87
Gráfica A.2	Experimento de degradación de pentano con adiciones sucesivas de sustrato.	92

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

El desarrollo de la tecnología ha sido decisivo para el bienestar de la humanidad. No obstante, la búsqueda de la maximización de la rentabilidad de las empresas a través de la tecnología en un ambiente de pocas restricciones, provocó que al mismo tiempo que se generaban satisfactores para el género humano, se crearan condiciones que perjudicaban su hábitat.

El proceso de refinación del petróleo es un área primordial para el desarrollo mundial. Sus actividades pueden contribuir a mantener la pureza del ambiente y a restaurar sus condiciones originales en sitios contaminados. Esto se logra de forma indirecta al suministrar combustibles cuya calidad se ajusta periódicamente, haciéndola más estricta para minimizar gradualmente sus efectos perjudiciales (Celestinos, 1995).

A finales de la década de los 70's, la Agencia de Protección al Ambiente (Environmental Protection Agency, EPA) de los EE.UU. comenzó a proteger la salud pública mediante requerimientos de cambios en la formulación de la gasolina. Los aditivos con plomo usados como mejoradores de octano fueron eliminados y las refinerías necesitaron un reemplazo. El más popular fue el metil ter-butil éter mejor conocido como MTBE (API, 1998; Ballard y Landwehr, 1990; Grisham, 1999; WSPA, 1998; Yang y col., 1998).

Básicamente el MTBE fue visto como un compuesto orgánico muy seguro. Su toxicidad es baja; es ligeramente carcinogénico en animales a dosis muy altas, pero de hecho menos que otros componentes de la gasolina. Como aditivo de gasolina tiene ciertas ventajas: un alto valor de referencia de octano y se mezcla bien con la gasolina. Por adición del 2% de MTBE a la gasolina, la producción se incrementó en un 7% comparada con gasolina del mismo octano sin MTBE. De tal forma, en 1979, el MTBE comenzó a usarse en alrededor de ese nivel en la gasolina (Grisham, 1999; Hanson, 1999-a).

En 1988 el primer programa de combustibles oxigenados en época invernal fue implantado en Denver EE.UU. usando 15% en volumen de MTBE para reducir las emisiones vehiculares de monóxido de carbono (API, 1998).

En 1990 se crearon las Enmiendas de la Ley de Aire Limpio (Clean Air Act Amendments CAAA) las cuales dieron lugar a dos programas de combustibles administrados por la EPA. Estos programas requirieron el uso de oxigenantes para incrementar el contenido de oxígeno de los combustibles y reducir por lo tanto ciertas emisiones durante la combustión (EPA, 1994-a; WSPA, 1998; Yang y col., 1998).

El primer objetivo de este programa que comenzó en el otoño de 1993, fue reducir las emisiones de monóxido de carbono en áreas donde los Estándares Nacionales de la Calidad del Aire Ambiental (National Ambient Air Quality Standard, NAAQS) fueran rebasados (Hanson, 1999-a; Yang y col., 1998).

El segundo programa que comenzó en 1995, requirió el uso de gasolinas reformuladas (Reformulated Gasoline RFG) conteniendo 2.0% en peso de oxígeno. Para lograr lo anterior se necesitó la adición de aproximadamente 15% de MTBE o 7.5% de etanol por volumen (Ballard y Landwehr, 1990; EPA, 1994-a; Hanson, 1999-a).

De acuerdo a la EPA, aproximadamente el 30% de la gasolina de los EE.UU. contiene actualmente alguna forma de oxigenante. Los posibles oxigenantes incluyen MTBE, etanol (EtOH), etil ter-butil éter (ETBE), ter-amil metil éter (TAME), ter-amil etil éter (TAEE), diisopropil éter (DIPE), dimetil éter (DME) y ter-butil alcohol (TBA). De estos compuestos el MTBE es el más utilizado, debido a su bajo costo, facilidad de producción y características favorables de transferencia y mezclado con gasolina (EPA, 1998; Fayolle y col., 1998; Morse, 1999), Kharoune y col, 2000).

Para nuestro país también se efectuaron cambios en la composición de la gasolina. En el invierno de 1993, se sustituyó el tetraetilo de plomo por MTBE (9% en vol.) en la gasolina Magna Sin (Figura 1.1) y es equivalente a la "Unleaded Regular" (gasolina regular sin plomo) de 87 de índice de octano (Celestinos, 1995).

En 1998 EE.UU. produjo 3.1 mil millones de galones de MTBE e importó 1.2 mil millones de galones para usarlos en gasolina. Paralelamente los residentes de varias comunidades en varios estados comenzaron a quejarse de mala salud, mareos, náuseas y dolores de cabeza y culparon del problema al MTBE. Sin embargo, por 1996 otro problema fue descubierto: el MTBE fue detectado en suministros de agua potable debido a fugas en tuberías subterráneas de gasolina y tanques de almacenamiento, provocando que el agua tuviera un sabor y olor desagradables (Grisham, 1999; Hanson, 1999-a).

Los llamados para la prohibición del uso del MTBE comenzaron tan pronto como se descubrió el agua contaminada. En marzo de 1999 el Gobernador de California, Gray Davis, anunció el retiro gradual del uso de MTBE en gasolina en el estado para el 31 de diciembre del 2002. California usaba el 25% de la producción global de MTBE en EE.UU hasta fechas anteriores al 2000 (Hanson, 1999-a; Morse, 1999; Rhodes, 1999).

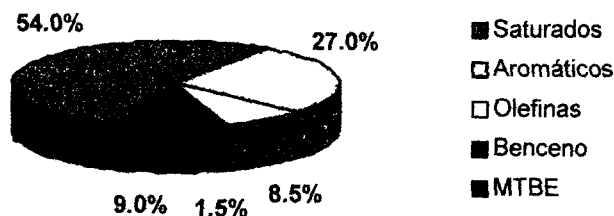


Figura 1.1 Composición de la gasolina mexicana Magna Sin (Celestinos, 1995)

México adiciona MTBE a todas sus gasolinas y ha construido plantas para la producción de los aditivos oxigenantes (MTBE y ter-amil metil éter: TAME) en las refinerías de Tula, Salamanca, Cadereyta y Salina Cruz. También realiza importaciones de MTBE. En enero del 2000 Jaime Mario Willars Andrade, director general de Pemex-Refinación, afirmó que Petróleos Mexicanos no tiene planes inmediatos para eliminar el uso de MTBE en sus gasolinas: *“En las cantidades en que se está usando el MTBE, los estudios científicos existentes indican que no hay ningún riesgo para la salud, pero si hay beneficios para la calidad del aire. Hemos visto que Alemania y otros países europeos no van a quitar el MTBE. Únicamente el estado de California lo prohíbe y eso se debe a casos específicos de contaminación de mantos freáticos en ese estado debido a su uso en lanchas”* (Shields, 2000).

No obstante, en 1998 la Academia Nacional de Ciencias de EE.UU. (National Academy Sciences, NAS) revisó los datos disponibles sobre los efectos de los oxigenantes de combustibles (MTBE en particular). La revisión de NAS estableció en parte que *“Ha habido una reducción sustancial en el ambiente de la concentración de CO en los pasados 20 años... el control de las emisiones vehiculares ha sido un factor principal en esta reducción”*. Es importante notar que la reducción de CO ocurrió aún antes de que cualquier gasolina reformulada conteniendo MTBE fuera introducida. En el mismo reporte de NAS, los investigadores también indicaron que muchos de los datos disponibles sugieren que se han incrementado las emisiones de óxido nitroso (NOx) desde que se usan oxigenantes (MTBE) de las gasolinas. Por otra parte, cualquier incremento en las emisiones de NOx podría resultar en la formación del dañino ozono (Mehlman, 1998).

1.1 Características del MTBE.

El metil ter-butil éter es una sustancia líquida incolora, inflamable, con un fuerte olor. No se encuentra en la naturaleza sino que es producido en muy grandes cantidades (más de 200,000 barriles por día en 1999) por 27 compañías en los Estados Unidos como se muestra en la Tabla 1.1 (EPA, 1994-a y EPA, 2000).

En la Tabla 1.2 se presentan varias propiedades del MTBE así como de otros oxigenantes de las gasolinas. Puede apreciarse que el MTBE es altamente soluble en agua por lo que es muy móvil en el subsuelo. El alto grado de solubilidad significa que el MTBE puede moverse rápidamente en la subsuperficie y es difícil de detectar sin análisis químicos. El MTBE no se absorbe bien a carbón o partículas del suelo (API, 1998; EPA, 1994-b; Yang y col. 1998).

1.2 Exposición al MTBE.

La liberación ambiental del MTBE puede ocurrir en sitios industriales involucrados en su manufactura o en el mezclado de MTBE con gasolina; durante el almacenamiento, distribución y transferencia de mezclas MTBE-gasolina; y de fugas o derrames en las gasolineras. Las emisiones industriales anuales totales de MTBE en los Estados Unidos en 1992 fueron de 3 millones de libras: 2.8 millones de libras al aire, 100 mil libras en aguas superficiales, 68 mil libras a sitios de inyección subterránea y 288 libras a tierra (EPA, 1994-a; EPA, 1994-b).

El MTBE se evapora cuando se expone al aire. Se disuelve cuando se mezcla con agua. La mayoría de las liberaciones ambientales del MTBE son al aire. Una vez en el aire puede contribuir a la formación de smog fotoquímico cuando reacciona con otras sustancias orgánicas volátiles (EPA, 1994-a). La concentración media de MTBE en la atmósfera en los Estados Unidos durante 1987-1988 fue estimada en <0.2 ppb. El MTBE se ha detectado en agua potable; los intervalos de concentración reportados van de 20 µg/L a más de 200 mg/L. No se espera que el MTBE persista en la atmósfera debido a su rápida reacción con radicales hidroxilo. El MTBE no absorbe la luz a longitudes de onda mayores a 210 nm; por lo tanto no se espera que su fotólisis directa por absorción de UV sea significativa atmosféricamente. Se ha calculado una vida media de 3.0 días en aire contaminado y 6.1 días en aire no contaminado. Se espera que MTBE se volatilice rápidamente de la superficie del suelo. La liberación de MTBE en el subsuelo como resultado de fisuras de tanques subterráneos de almacenamiento puede ser persistente (EPA, 1994-b).

TABLA 1.1 PRODUCTORES DE MTBE DE EE.UU.

COMPAÑÍA	LOCALIZACIÓN DE LA PLANTA	CAPACIDAD DE LA PLANTA (EN MILLONES DE LIBRAS)
AMOCO	Whiting, IN	285
	Yorktown, VA	50
ARCO CHEMICAL	Channelview, TX	3610
	Corpus Christi, TX	1140
ARCO PETROLEUM	Carson, CA	240
ASHLAND OIL	Catlettsburg, KY	305
CHAMPLIN REFINING Co.	Corpus Christi, TX	165
CHEVRON	El Segundo, CA	190
	Pascagoula, MS	200
CITGO	Lake Charles, OK	255
CONOCO, INC.	Ponca City, OK	133 ^a
	Westlake, LA	133 ^a
CROWN CENTRAL PETROLEUM	Pasadena, TX	285
DIAMOND SHAMROCK	Sunray, TX	200
ENRON	LaPorte, TX	1425
EXXON CHEMICAL	Baytown, TX	285
FINA OIL & CHEMICAL	Big Spring, TX	48
GLOBAL OCTANES (MITSUI)	Deer Park, TX	1188
HILL PETROLEUM (PHIBRO)	Houston, TX	130
KERR McGEE	Corpus Christi, TX	171
LYONDELL PETROCHEMICAL	Channelview, TX	285
MARATHON OIL (USX)	Detroit, MI	133 ^a
	Robinson, IL	133 ^a
MARK WEST	South Shore, KY	162
MOBIL	Beaumont, TX	240
OXYCHEM	Chocolate Bayou, TX	190
PHILLIPS	Sweeny, TX	285
STAR ENTERPRICES (TEXACO/ARAMCO)	Convent, LA	190
SUN REFINING & MARKETING Co.	Marcus Hook, PA	240
TEXACO	Port Neches, TX	950
TEXAS PETROCHEMICALS CORP.	Houston, TX	2090
VALERO REFINING Co.	Corpus Christi, TX	160

Fuente: EPA, 1994-b (EPA 749-F-94-017^a)

TABLA 1.2 IDENTIDAD QUÍMICA Y PROPIEDADES QUÍMICAS/FÍSICAS DE OXIGENANTES DE GASOLINA.

NOMBRE QUÍMICO	METIL TER-BUTIL ÉTER	ETIL TER-BUTIL ÉTER	TER-AMIL METIL ÉTER	DIISOPROPIL ÉTER
SINÓNIMOS COMUNES	MTBE; 2-Metoxi-2-metil-propano, ter-butil metil éter; metil terciario butil éter.	ETBE; ter-butil etil éter; propano-2-etoxi-2-metil; 1,1-dimetil etil éter.	TAME; 2-metoxi-2-metil butano; metil ter-pentil éter; 1,1-dimetilpropil metil éter; metil ter-amil éter.	DIPE; 2'2-oxybispropano; 2-isopropoxi-propano; éter diisopropílico
FORMULA MOLECULAR	C ₅ H ₁₂ O	C ₆ H ₁₄ O	C ₆ H ₁₄ O	C ₆ H ₁₄ O
FORMULA ESTRUCTURAL	CH ₃ OC(CH ₃) ₃	(CH ₃) ₃ COCH ₂ CH ₃	CH ₃ CH ₂ C(CH ₃) ₂ OCH ₃	(CH ₃) ₂ CHOCH(CH ₃) ₂
PESO MOLECULAR	88. 15	102. 18	102. 18	102. 18
DENSIDAD (g/mL a 20°C)	0. 74	0. 7495	0. 77	0. 7258
SOLUBILIDAD (g/100 g de agua)	5. 12	1. 2	1. 2	0. 2
PUNTO DE FUSIÓN	- 109°C	- 103°C		- 86. 9°C
PUNTO DE EBULLICIÓN (a 760 mm Hg)	55. 2°C	72. 2°C	86. 3°C	68. 2°C
PRESIÓN DE VAPOR (mm Hg a 20°C)	240	130	75	159
CONSTANTE DE LA LEY DE HENRY (Atm·m ³)/(g·mol)	5. 28 X 10 ⁻⁴ a 3 X 10 ⁻³	2. 64 X 10 ⁻³	1. 95 X 10 ⁻³	4. 77 X 10 ⁻³
Adimensional	2. 2 X 10 ⁻² a 1. 2 X 10 ⁻¹	0. 11	0. 081	0. 199
Log Kow*	0.94 a 1.16			
FACTORES DE CONVERSIÓN	1 ppm = 3. 605 mg/m ³ ; 1 mg/m ³ = 0. 277 ppm			

Fuentes: EPA, 1994-b (EPA 749-F-94-017*); EPA, 1998 (EPA/600/R-98/048); Dean, 1989.

* Eweis y col. (1997)

TABLA 1.2 IDENTIDAD QUÍMICA Y PROPIEDADES QUÍMICAS/FÍSICAS DE OXIGENANTES DE GASOLINA (cont.)

NOMBRE QUÍMICO	TER-AMIL ÉTIL ÉTER	DIMETIL ÉTER	TER-BUTIL ALCOHOL	ETANOL
SINÓNIMOS COMUNES	TAE; etil ter-amil éter; butano-2-etoxi-2-metil.	Metano, oxibis	TBA; 2-metil-2- propanol	Alcohol etílico
FORMULA MOLECULAR	$C_7H_{16}O$	C_2H_6O	$C_4H_{10}O$	C_2H_6O
FORMULA ESTRUCTURAL	$CH_3CH_2C(CH_3)_2OCH_2CH_3$	CH_3OCH_3	$(CH_3)_3COH$	CH_3CH_2OH
PESO MOLECULAR	116. 20	46. 07	74. 12	46. 07
DENSIDAD (g/mL a 20°C)	0. 75	0. 661	0. 7858	0. 7894
SOLUBILIDAD (g/100 g de agua)	NA	4. 7 a 35. 3	miscible	miscible
PUNTO DE FUSIÓN		- 141. 5°C	25. 8°C	- 114°C
PUNTO DE EBULLICIÓN (a 760 mm Hg)	102°C	-24. 9°C	82. 4°C	78. 3°C
PRESIÓN DE VAPOR (mm Hg a 20°C)	NA	758 a 5086 (a 25°C)	41	44
CONSTANTE DE LA LEY DE HENRY (Atm·m ³)/(g·mol)	NA	4. 89 X 10 ⁻⁴ a 9. 97 X 10 ⁻⁴	1. 21 X 10 ⁻⁵	6. 91 X 10 ⁻⁶
Adimensional	NA	2. 03 X 10 ⁻² a 4. 15 X 10 ⁻²	5. 03 X 10 ⁻⁴	2. 83 X 10 ⁻⁴
FACTORES DE CONVERSIÓN				

Fuentes: EPA, 1994-b (EPA 749-F-94-017^a); EPA, 1998 (EPA/600/R-98/048); Dean, 1989.

La vida media por volatilización en corrientes, ríos y lagos de el MTBE se estima en 2.5 h, 9.5 h y 3,269 h (137 días), respectivamente. No se espera que se hidrolice, fotolice o sea adsorbido a los sedimentos o partículas suspendidas (EPA, 1994-b).

De acuerdo con la EPA (1994-a), la exposición al MTBE puede ocurrir en lugares de trabajo o en el ambiente por liberaciones al aire, agua, tierra o mantos freáticos. La exposición puede también ocurrir cuando la gente:

- Está en lugares donde la gasolina es bombeada a vehículos.
- Llena equipos domésticos que trabajan con gasolina.
- Vive cerca de gasolineras o
- Vive cerca de estaciones de servicio que pueden liberar gasolina de contenedores de almacenamiento subterráneos.

1.3 Efectos a la Salud.

El MTBE entra al cuerpo por inhalación de aire contaminado o cuando se consumen alimentos o agua contaminados. También es absorbido a través de la piel. No permanece en el cuerpo como MTBE debido a su rompimiento y degradación (EPA, 1994-a; EPA, 1994-b).

De acuerdo con los estudios de NAS, el MTBE causa enfermedades respiratorias (asma, bronquitis y una gran variedad de problemas respiratorios) y enfermedades alérgicas (problemas nasales y de irritación de conductos respiratorios). Se han reportado enfermedades neurológicas incluyendo dolor de cabeza, ansiedad, falta de concentración, insomnio y depresión. Los resultados de estudios en animales mostraron que el MTBE es probablemente un carcinógeno humano y causa diferentes tipos de cáncer como leucemia y linfoma, así como tumores malignos de riñones, testículos e hígado. Cuando es inhalado o ingerido, el MTBE es convertido en formaldehído, (un conocido cancerígeno humano que ha sido asociado con cánceres nasofaríngeos, de las cavidades y senos nasales) y ter-butyl alcohol (TBA). El metabolito de MTBE, TBA ha causado cáncer en riñones y tiroides. El MTBE causa cáncer en animales en muchos órganos y tejidos idénticos a los causados por exposición a las mismas dosis de benceno, cloruro de vinilo y 1,3-butadieno” (EPA, 1994-b; Mehlman, .1998).

Los efectos a la salud humana asociados con la inhalación o el consumo de grandes cantidades de MTBE por cortos periodos de tiempo son desconocidos. Estudios de laboratorio muestran que la respiración de grandes cantidades de MTBE por cortos periodos de tiempo tienen un efecto adverso al sistema

nervioso de animales. El rango de efectos van de hiperactividad y falta de coordinación a convulsiones e inconsciencia. Las consecuencias a la salud humana debidas a la respiración o consumo de pequeñas cantidades de MTBE por periodos prolongados de tiempo son desconocidos. Las investigaciones sugieren que la exposición repetida a grandes cantidades de MTBE en aire causa daño a riñones y afecta el desarrollo de fetos en animales. Los estudios también muestran que la exposición al MTBE en aire durante el tiempo de vida causa cáncer en animales. La dosis letal 50 (LD50) oral para animales se ha reportado de 1.6-3.9 g/Kg para roedores (EPA, 1994-a; EPA, 1994-b).

1.4 Transformación del MTBE.

En general, los alquil éteres son una clase de compuestos muy estables en un amplio rango de condiciones industriales y de laboratorio y existe poca información de su biodegradabilidad en suelo, agua y lodos activados ambientales (Hardison y col., 1997).

Los procesos de transformación incluyen una variedad de procesos químicos, físicos o biológicos que generalmente reducen la masa, toxicidad, movilidad, volumen o concentración de contaminantes en suelo, agua y aire.

No obstante, la clave para evaluar el destino de los compuestos orgánicos en el ambiente, es una evaluación de su susceptibilidad de *mineralización* (la conversión a dióxido de carbono, agua y varias formas inorgánicas).

Para la superficie del agua, los procesos potenciales de transformación son la biodegradación, fotólisis e hidrólisis. En aguas subterráneas, los procesos potenciales de transformación incluyen la biodegradación e hidrólisis. En aguas superficiales la fotólisis es el proceso de transformación más importante para éteres oxigenantes y la biodegradación es el proceso más importante para los alcoholes. Los productos de la degradación de MTBE incluyen TBA y ter-butyl formiato (TBF). Sin embargo aún no se ha realizado la completa identificación de los productos de biodegradación y no se han esclarecido las vías de reacción (EPA, 1998).

Mientras la fotooxidación y otros mecanismos abióticos juegan un papel en la transformación de los químicos orgánicos, pocos son capaces de convertirlos totalmente en productos inorgánicos en la naturaleza, en cambio, la mineralización es alcanzada generalmente como una consecuencia de la actividad microbiana (Kharoune y col., 1997; Kang y col., 1999). Los compuestos orgánicos son a menudo clasificados como biodegradables, persistentes o recalcitrantes. *Biodegradación* significa la transformación

biológica de un compuesto químico orgánico a otra forma; la extensión de esta transformación no está implícita. Sin embargo, cuando los científicos o ingenieros establecen que un compuesto químico es biodegradable, usualmente quieren decir que puede ser mineralizado. En contraste, *biodegradación primaria* es usualmente usada para denotar una sola reacción de transformación mientras que *biodegradación parcial* significa cualquier cosa entre biodegradación primaria y mineralización (Grady, 1985).

Aunque el término *recalcitrancia* ha sido usado en un gran número de formas, Bull (citado por Grady, 1985) lo ha definido como la resistencia inherente de un compuesto químico a cualquier grado de biodegradación e introdujo el término *persistencia* que significa que la biodegradación de una sustancia falla bajo un conjunto especificado de condiciones.

Las bacterias pueden hacer solamente aquellas actividades metabólicas para las cuales tienen una capacidad genética. Más aún, no todas las bacterias pueden hacer todas las actividades y el ambiente es un factor importante para determinar si una reacción puede llevarse a cabo por un organismo genéticamente capaz de realizarla. En consecuencia, aún para compuestos biogénicos, no existe garantía de que la biodegradación pueda ocurrir en un ambiente en particular. Primero un organismo capaz de llevar a cabo la degradación biológica debe estar presente; segundo, debe existir una oportunidad para que las enzimas requeridas sean sintetizadas y tercero, las condiciones ambientales deben ser suficientes para que las reacciones catalizadas enzimáticamente procedan a una velocidad significativa. Hay numerosos ejemplos reportados en los que compuestos potencialmente persistentes han sido modificados por microorganismos o completamente mineralizados por comunidades mixtas de microorganismos; por ejemplo compuestos xenobióticos tales como los pesticidas. Estas situaciones ponen de manifiesto la habilidad de los microorganismos de transformar compuestos que no pueden utilizar como única fuente de carbono y energía (Grady, 1985).

En vista de lo expuesto anteriormente, ¿Cómo pueden los microorganismos llevar a cabo la biodegradación y aún la mineralización de xenobióticos? La respuesta radica en el hecho de que la estereoespecificidad de las enzimas no es exacta.

1.4.1 Biodegradación Gratuita.

La mayoría de los libros de texto enfatizan la especificidad de las enzimas. Lo que algunas veces no es claro, sin embargo, es que la principal especificidad exhibida por las enzimas es con respecto a su función catalítica, i.e., el tipo de

reacción que median. Existe mucho menos especificidad con respecto al sustrato al que se enlazan, aunque el grado de especificidad depende de las enzimas en cuestión. Consecuentemente no es poco común que las enzimas enlacen análogos del sustrato natural. Si la estructura de estos análogos no altera sensiblemente la carga natural del sitio activo, entonces es posible que la enzima catalice una reacción específica sobre el compuesto xenobiótico. Esta aproximación de una enzima que presenta actividad catalítica hacia un sustrato nuevo ha sido llamada *metabolismo fortuito o gratuito*. El éxito del metabolismo gratuito depende de ciertos factores, entre los que se pueden mencionar la capacidad del xenobiótico para inducir la síntesis de la enzima requerida y la naturaleza de los productos resultantes. Es evidente, sin embargo, que si el compuesto xenobiótico es incapaz de provocar la inducción de la enzima requerida, entonces su biodegradación solamente ocurrirá en la presencia del inductor natural. Para que organismos de una sola especie puedan continuamente llevar a cabo metabolismo gratuito de un sustrato xenobiótico como única fuente de carbono y energía, deben en última instancia ser capaces de extraer energía y poder reductor de las reacciones. Si no pueden hacerlo no podrán mantener su integridad celular y eventualmente morirán. En tal situación, la única manera en la cual puede efectuarse la biodegradación continua del compuesto xenobiótico es a través del uso de fuentes adicionales de carbono y energía o de la acción de otros organismos en una comunidad microbiana mixta (Grady, 1985).

1.4.2 Cometabolismo.

Aunque el cometabolismo ha sido definido de muchas maneras, en este trabajo se define como *la transformación de una sustancia no asimilable (el cometabolito) en la presencia obligada de un sustrato de crecimiento u otro compuesto transformable*. Existen dos conceptos clave en esta definición. Primero, una sustancia no asimilable es definida como aquella que no permite la división celular de los microorganismos. En otras palabras, es aquella que no puede servir como la única fuente de carbono y energía para un cultivo puro. Segundo la transformación ocurrirá solamente en la presencia obligada de un sustrato de crecimiento (Criddle, 1993; Grady, 1985). Dalton y Stirling (1982) añaden este requerimiento para hacer una distinción entre cometabolismo y metabolismo gratuito.

“Considérese la situación en la cual un sustrato xenobiótico puede ser transformado por una enzima presente dentro de una célula sin la necesidad de energía o poder reductor para realizar la transformación pero con la acumulación de un producto no metabolizable. El cultivo no crecería y la transformación eventualmente cesaría”. Dalton y Stirling (1982) clasificaron esto como simple metabolismo gratuito. Por otro lado, si se requiriera energía o poder reductor

para transportar el compuesto xenobiótico al interior de la célula o para llevar a cabo su transformación, entonces ésta no ocurriría cuando el compuesto se añadiera a un cultivo porque las células no podrían extraer energía de su metabolismo subsecuente para conducir el primer paso dependiente de energía. Solamente cuando un sustrato de crecimiento u otro compuesto transformable estuviera presente que pudiera producir energía para conducir la reacción inicial, ocurriría la transformación. Dalton y Stirling (1982) definen esta situación como cometabolismo. Si un compuesto xenobiótico es cometabolizado por un cultivo puro, entonces los productos metabólicos siempre se acumularán debido a la propia naturaleza del cometabolismo. Esto es, si los productos metabólicos pudieran ser completamente metabolizados, eventualmente podrían proporcionar energía que sería usada por un paso de metabolismo gratuito que requiriera energía, permitiendo por lo tanto que el compuesto sirviera como la única fuente de carbono y energía para el crecimiento, lo cual por definición no es cometabolismo (Grady, 1985).

La producción de metabolitos por el ataque cometabólico de un compuesto xenobiótico bien puede no resultar en su acumulación dentro del medio si el organismo que lleva a cabo el cometabolismo está creciendo en una comunidad microbiana mixta (consorcio microbiano). En tal caso hay una buena oportunidad de que el cometabolito pueda ser degradado por otras especies dentro de la comunidad. De esta manera, el ataque concertado de muchos microbios dentro de una comunidad pueden dirigir la degradación completa de un compuesto xenobiótico aún cuando ningún organismo dentro de la comunidad sea capaz de usar totalmente el sustrato. En consecuencia, las comunidades microbianas pueden usar como fuentes de carbono y energía compuestos que no pueden ser degradados por algún organismo solo (OECD, 1994).

1.5 Control de la contaminación por MTBE.

Debido a las características únicas del MTBE, la selección de una estrategia apropiada para la remediación de sitios contaminados con este contaminante es más compleja que para otros compuestos como el benceno, tolueno, etil benceno o xilenos. La Figura 1.2 muestra una visión global de distintas técnicas propuestas para la remediación de sitios contaminados con MTBE (Yang y col., 1998) cuya selección depende de la evaluación de riesgos lo cual involucra la recepción de muestras, caracterización de la extensión de la contaminación (detección de impacto), caracterización del marco hidrogeológico y condiciones biológicas.

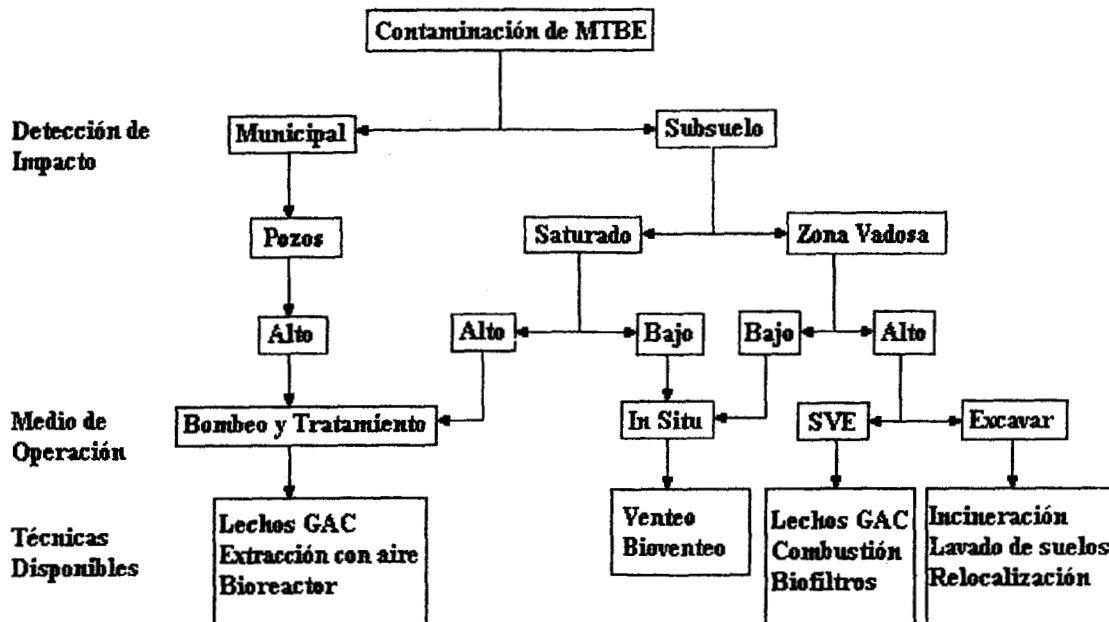


Figura 1.2 Visión general de estrategias de remediación. Yang y col. 1998

Entre las diferentes tecnologías disponibles para la remoción de contaminantes de suelos, mantos freáticos y agua potable, algunas han sido propuestas para la remoción de MTBE. A continuación se describen algunas de ellas (reportadas en EPA, 1995 y en CPEO, 1998 excepto inciso 1.5.7 *Oxidación con peróxido de hidrógeno*):

1.5.1 Extracción de vapores del suelo (Soil Vapor Extraction, SVE)

También conocida como venteo de suelos (*soil venting*) o extracción al vacío (*vacuum extraction*), es una tecnología de remediación *in situ* que reduce la concentración de los constituyentes volátiles de los productos del petróleo adsorbidos al suelo en la zona insaturada (vadosa). En esta tecnología, una presión negativa es aplicada a través de pozos cerca de la fuente de contaminación en el suelo. Los componentes volátiles de la masa contaminante se “evaporan” y los vapores son succionados hacia los pozos de extracción. El vapor extraído es entonces tratado según sea necesario (comúnmente con adsorción a carbón) antes de que sea liberado a la atmósfera. Esta tecnología es comúnmente usada para remover contaminantes de la gasolina de las zonas insaturadas en sitios donde se produjo algún derrame. Basada en su alta presión

de vapor y baja afinidad por carbono orgánico en suelos, se espera que el MTBE sea fácilmente removido del suelo por extracción de vapor.

1.5.2 Desorción térmica a baja temperatura (Low Temperature Thermal Desorption, LTTD).

También conocida como volatilización térmica a baja temperatura (*low-temperature thermal volatilization*), remoción térmica (*thermal stripping*) y tostado de suelos (*soil roasting*) es una tecnología de remediación *ex situ*, que usa temperaturas por debajo de los niveles de ignición para separar contaminantes volátiles de suelos excavados. Los desorbedores térmicos son diseñados para calentar suelos a temperaturas suficientes para causar que los contaminantes se volatilicen y desorban (separen físicamente) del suelo. Aunque no son diseñados para descomponer los constituyentes orgánicos, los desorbedores térmicos pueden, dependiendo de los componentes orgánicos específicos presentes y de la temperatura del sistema desorbedor, causar que algunos de los constituyentes se descompongan completa o parcialmente. Los contaminantes vaporizados son generalmente tratados en una unidad de tratamiento secundaria ya sea un quemador, una cámara de oxidación catalítica, un condensador o una unidad de adsorción con carbón antes de descargar a la atmósfera.

Debido a la alta presión de vapor del MTBE, tanto SVE como LTTD son técnicas muy efectivas en la remoción del MTBE del suelo. Sin embargo, debido a que el MTBE se separa de la gasolina y se disuelve rápidamente en agua, SVE y LTTD deben ser usadas tan pronto como ocurra una liberación; de otra forma la mayoría del MTBE puede haber migrado ya del suelo a los mantos freáticos u otros cuerpos de agua.

1.5.3 Adsorción con carbón activado granular (Granular Activated Carbon, GAC)

Sorción es el término común usado tanto para absorción como adsorción. Estos términos son a menudo confundidos. Absorción es la incorporación de una sustancia en un estado a otra de un estado diferente (v.g. líquidos que son absorbidos por un sólido o gases que son absorbidos por agua). Adsorción es la adherencia física o enlace de iones y moléculas a una superficie de otra molécula. La mayoría de las técnicas de sorción actúan como una esponja o filtro. En las tecnologías de adsorción de líquidos, los contaminantes que están en solución (i.e. solutos) se adsorben a la superficie de un sorbente, el adsorbente más común es el carbono activado granular (granular activated

carbon, GAC). Debido a la capacidad limitada de adsorción del carbón activado para el MTBE, no se espera que la adsorción sea generalmente usada para su remoción en gran escala. Esto es cierto a concentraciones elevadas en el influente que limitarían el tiempo en el que una columna GAC sería efectiva.

1.5.4. Arrastre con Aire o Venteo (Air Sparging)

El arrastre con aire es el proceso que consiste en la inyección directa de aire en aguas subterráneas. El arrastre con aire remedia aguas subterráneas por volatilización de los contaminantes y mejorando la biodegradación. Conforme las burbujas emergen, los contaminantes son removidos del agua subterránea por contacto físico con el aire (i.e. arrastre) y son llevadas hacia la zona insaturada (i.e. zona vadosa del suelo). Una vez que los contaminantes se mueven hacia la zona vadosa, un sistema de extracción de vapor es usualmente usado para remover los vapores. Para compuestos orgánicos volátiles, el arrastre con aire es una alternativa efectiva. Sin embargo, la constante de Henry para MTBE es muy baja, lo cual indica una eficiencia relativamente pobre para el arrastre con aire.

1.5.5 Extracción con aire (Air Stripping)

La extracción con aire es una tecnología en la cual los componentes volátiles (VOCs) son transferidos de agua contaminada extraída del subsuelo al aire. Típicamente, la extracción con aire tiene lugar en una torre empacada conocida como extractor con aire (air stripper) o en un tanque de aireación. El “extractor con aire” incluye un aspersor en la tapa de la torre. Este forma un rocío con el agua subterránea que es bombeada a la superficie y forzada a pasar a través de la columna empacada. Conforme el agua desciende, aire ascendente es forzado a través de la columna, extrayendo los compuestos volátiles. El uso de deflectores dentro de la torre incrementan el área de transferencia del agua al aire, maximizando así la cantidad de volatilización.

1.5.6 Bioventeo (Bioventing)

El bioventeo es un proceso que consiste en la estimulación de los microorganismos que se encuentran normalmente en el suelo para que degraden los compuestos presentes en el suelo al proporcionarles oxígeno. La velocidad de la degradación natural es limitada generalmente por la carencia de oxígeno y otros aceptores de electrones (i.e. un compuesto que gana electrones durante la biodegradación) más que por la carencia de nutrientes (i.e. donadores de electrones). En los sistemas convencionales de bioventeo, el oxígeno es

proporcionado por un compresor a pozos subsuperficiales. En contraste a la extracción de vapores del suelo, el bioventeo usa bajas velocidades de flujo de aire para proporcionar solamente oxígeno suficiente para sostener la actividad microbiana.

1.5.7 Oxidación con peróxido de hidrógeno.

Yeh (1995) encontró que el peróxido de hidrógeno en presencia de hierro (reacción de Fenton) degrada ETBE y MTBE. Por lo tanto los radicales hidroxilo producidos en la reacción de Fenton parecen ser un agente efectivo de tratamiento. El ozono, ozono/UV, y ozono/peróxido también tienen potencial como tecnologías de tratamiento para la destrucción de oxigenantes. Debido a que estos sistemas incrementan la biodegradabilidad de los residuos orgánicos en el agua, la biofiltración puede ser recomendada para continuar con la oxidación para el control de los residuos biodegradables. Esto resultaría en un proceso efectivo de dos etapas: oxidación abiótica seguida por biodegradación aeróbica del oxigenante (Kharoune y col., 1997; Kang y col., 1999).

1.5.8 Biofiltración.

La biofiltración es una tecnología en la cual los contaminantes presentes en una fase gaseosa, tales como los hidrocarburos, pasan a través de un lecho sólido donde son adsorbidos y posteriormente degradados por la acción de microorganismos. Diferentes cepas microbianas pueden ser introducidas en un biofiltro para degradar preferencialmente compuestos específicos. La gran ventaja del uso de los biofiltros es que los contaminantes son destruidos y no solo transferidos de una fase a otra. Sin embargo el crecimiento excesivo de microorganismos puede taponar los biofiltros, requiriendo limpieza mecánica periódica. Su efectividad depende de la biodegradabilidad de los contaminantes y de la presencia de poblaciones microbianas adecuadas para llevar a cabo la degradación de los contaminantes así como del mantenimiento de las condiciones propicias para el desarrollo de dichas poblaciones.

CAPÍTULO II

ESTADO DEL ARTE

2. ESTADO DEL ARTE

La degradación de muchos compuestos de la gasolina es bien conocida, sin embargo existe poca información del destino biológico de los compuestos usados como oxigenantes de las gasolinas reformuladas. A la fecha hay relativamente pocos estudios de degradación microbiológica del oxigenante MTBE. La estructura de esta sustancia con un carbono terciario y un enlace éter lo convierten en un compuesto muy estable bajo un amplio rango de condiciones ambientales. Se han realizado estudios de degradación tanto anaerobios como aerobios que muestran la dificultad de encontrar microorganismos capaces de degradar al MTBE al mismo tiempo que señalan a las condiciones aerobias como una mejor alternativa para estudios posteriores.

2.1 Degradación Anaerobia.

Suflita y Mormile (1993) estudiaron la biodegradación anaerobia de oxigenantes de la gasolina conocidos (MTBE, ETBE y TAME) y potenciales (butil metil éter) utilizando sedimentos y agua subterránea obtenidos de la porción metanogénica de un manto acuífero anóxico contaminado con lixiviados de rellenos sanitarios municipales. Ellos encontraron que los éteres son moléculas relativamente persistentes que generalmente resistieron su destrucción anaerobia. Después de 182 días, no encontraron evidencia de la destrucción anaerobia de los oxigenantes de la gasolina MTBE, ETBE o TAME. Solamente el butil metil éter, el análogo de cadena recta de MTBE fue capaz de ser convertido a metano en un 99% de la cantidad teórica estimada.

Mormile y col. (1994) investigaron el destino de compuestos oxigenados bajo condiciones anaerobias, ya que estas condiciones se desarrollan rápidamente en mantos acuíferos contaminados con hidrocarburos. En este estudio emplearon tanto muestras de sedimentos anaerobios como dos cultivos puros: *Acetobacterium woodii* (ATCC 29683) y *Eubacterium limosum* (ATCC 8486) que se sabe metabolizan una variedad de metil éteres y tienen un papel central en vías degradativas anaerobias. En estos estudios observaron que los éteres oxigenados fueron en general muy difíciles de degradar, aún cuando los sedimentos tuvieran una historia previa de contaminación. La presencia de aceptores alternos de electrones no facilitó la biodegradación de los éteres. El MTBE fue parcialmente transformado solo en una de varias muestras de sedimentos anaerobios. La transformación de MTBE en esta muestra activa requirió más de 152 días de incubación, resultando en alrededor del 50% de transformación de MTBE y produciendo cantidades cercanamente estequiométricas de TBA. El MTBE no fue degradado por ninguna de las dos bacterias anaerobias *A. woodii* y *E. limosum* que fueron capaces de degradar varios éteres no ramificados.

Yeh y Novak (1994), evaluaron la biodegradación de MTBE, ETBE y TBA en microcosmos en condiciones metanogénicas y desnitrificantes por consorcios de muestras de tres diferentes suelos. Sus resultados indican que el TBA fue el compuesto más fácil de biodegradar (hasta 0.15 mg/L·día·g suelo seco), mientras que el MTBE fue el más recalcitrante. Esto hace pensar que el rompimiento del enlace éter en el MTBE y el ETBE es el paso limitante en la degradación de estos orgánicos. La degradación de MTBE (0.05 mg/L·día·g suelo seco) y ETBE (0.15 mg/L·día·g suelo seco) ocurrió solo en la muestra de suelo con el más bajo contenido de materia orgánica. No se observó degradación en suelos ricos en compuestos orgánicos.

2.2 Degradación Aerobia.

Con respecto la degradación aerobia del MTBE, se ha reportado un mayor número de trabajos con resultados positivos, si bien inicialmente algunos trabajos fueron negativos.

Salanitro y col. (1994), aislaron un cultivo mixto aerobio (BC-1) desarrollado a partir de lodos activados de plantas de biotratamiento municipales, de refinerías y de la industria química. Dicho consorcio fue capaz de degradar consistentemente MTBE (120 mg/L) a una velocidad de 34 mg/h·g de células. El consorcio BC-1 contenía al menos cuatro o cinco microorganismos, incluyendo coryneformes, pseudomonas y acromobacterias, sin embargo ninguno de estos microorganismos mostró crecimiento sobre MTBE como única fuente de carbono. En experimentos de remoción de sustrato en un cultivo en lotes, encontraron que ter-butil alcohol (TBA) se formó como un producto metabólico transitorio del rompimiento del MTBE. Los más altos niveles de TBA se alcanzaron después de que el MTBE fue completamente utilizado, posteriormente la concentración de TBA formado declinó, por lo que los autores concluyen que sus resultados proporcionan evidencia que el consorcio BC-1 transformó MTBE a TBA como intermediario primario.

Horan y Brown, (1995) investigaron la interacción entre MTBE y la degradación de un hidrocarburo alcano representativo: hexadecano, el cual se encuentra en muchos productos del petróleo incluyendo petróleo crudo y gasolina. Estos estudios se realizaron usando protocolos respirométricos. Para estos experimentos se trató de seleccionar un consorcio microbiano capaz de metabolizar MTBE usando técnicas de enriquecimiento. Sus resultados muestran que la cantidad de hexadecano mineralizado decrece como una función del MTBE añadido. Encontraron además que el oxígeno fue utilizado por un consorcio limitado en carbono cuando se añadieron pequeñas cantidades de MTBE como única fuente de carbono. Esto proporcionó evidencia indirecta de

que el MTBE puede de ser metabolizado por poblaciones microbianas, ya que el oxígeno es el aceptor terminal de electrones en el metabolismo aerobio. Sin embargo, no pudieron estabilizar algún consorcio con MTBE como la única fuente de carbono, y de hecho encontraron que el enriquecimiento cesó de utilizar O₂ cuando el MTBE alcanzó aproximadamente 10 ppm en el envase de cultivo. Los autores concluyen que es poco probable que el MTBE pudiera servir como la única fuente de carbono para microorganismos.

Sin embargo, la degradación de MTBE como única fuente de carbono ha sido reportada por Mo y col. (1995). Estos autores reportan haber aislado 15 cepas bacterianas puras de lodos activados de plantas de biotratamiento y otras fuentes con capacidad de degradar MTBE: el 40% de 200 ppm en 1 a 2 semanas como la única fuente de carbono. Siete de las cepas aisladas se identificaron como pertenecientes a los géneros *Rhodococcus*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* u *Oerskovia*. Estas cepas también degradaron t-butanol, butilformiato, isopropanol, acetona y piruvato como única fuente de carbono. El uso de estos compuestos en combinación con MTBE mostró una reducción en la degradación de MTBE. Sin embargo el precrecimiento en t-butanol seguido por una transferencia a medio conteniendo MTBE resultó en una degradación mayor de MTBE.

Mo y col. (1996) desarrollaron un cultivo mixto de lodos activados que utilizaron MTBE como única fuente de carbono en un biorreactor durante un periodo de más de un año. El reactor mantuvo una actividad degradativa estable. Comparado con cultivos puros, el cultivo mixto mostró mayor capacidad de degradación de MTBE. En cultivos por lotes, el cultivo mixto degradó 100 ppm de MTBE después de tres días de incubación. La adición de otros éteres causó una aparente reducción en la degradación de MTBE.

Mo y col. (1997) aislaron tres cultivos bacterianos puros que degradan MTBE, a partir de lodos activados y del fruto del árbol del Ginko. Los géneros aislados son: *Methylobacterium*, *Rhodococcus* y *Arthrobacter*. El árbol del Ginko fue seleccionado porque produce ácido butírico y/o contiene grupos butil terciarios en su fruto. Estos estudios mostraron que las cepas aisladas degradaron 60 ppm de MTBE como única fuente de carbono después de 2 semanas.

Hardison y col. (1997) señalan que se ha demostrado que el citocromo P-450s en mamíferos puede hidroxilar n-alcanos gaseosos y puede O-dealquilar tanto dietil éter (DEE) como MTBE. En vista de que al parecer el citocromo P-450 está involucrado en la oxidación de n-alcanos por *Graphium sp.* ellos se interesaron en determinar si este hongo también oxida DEE y MTBE. Sus resultados mostraron que el DEE es utilizado como un sustrato que soporta el crecimiento (a una velocidad inicial de 90-92 nmol/h·mg peso seco) pero el

MTBE es sólo parcialmente oxidado en una reacción co-metabólica (a una velocidad inicial de 0.6 nmol/h-mg peso seco). Sus resultados también sugieren que la oxidación inicial de DEE (ortodealquilación a 1-etoxi-1-etanol y posterior formación de etanol), MTBE (a ter-butoxi metanol) y n-alcanos gaseosos son todas catalizadas por el mismo citocromo P-450 y que la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa está involucrada en la posterior transformación de los productos de la oxidación inicial de cada sustrato (etanol en acetaldehído en el caso del DEE y terbutoxi metanol a ter-butil formiato en el caso del MTBE).

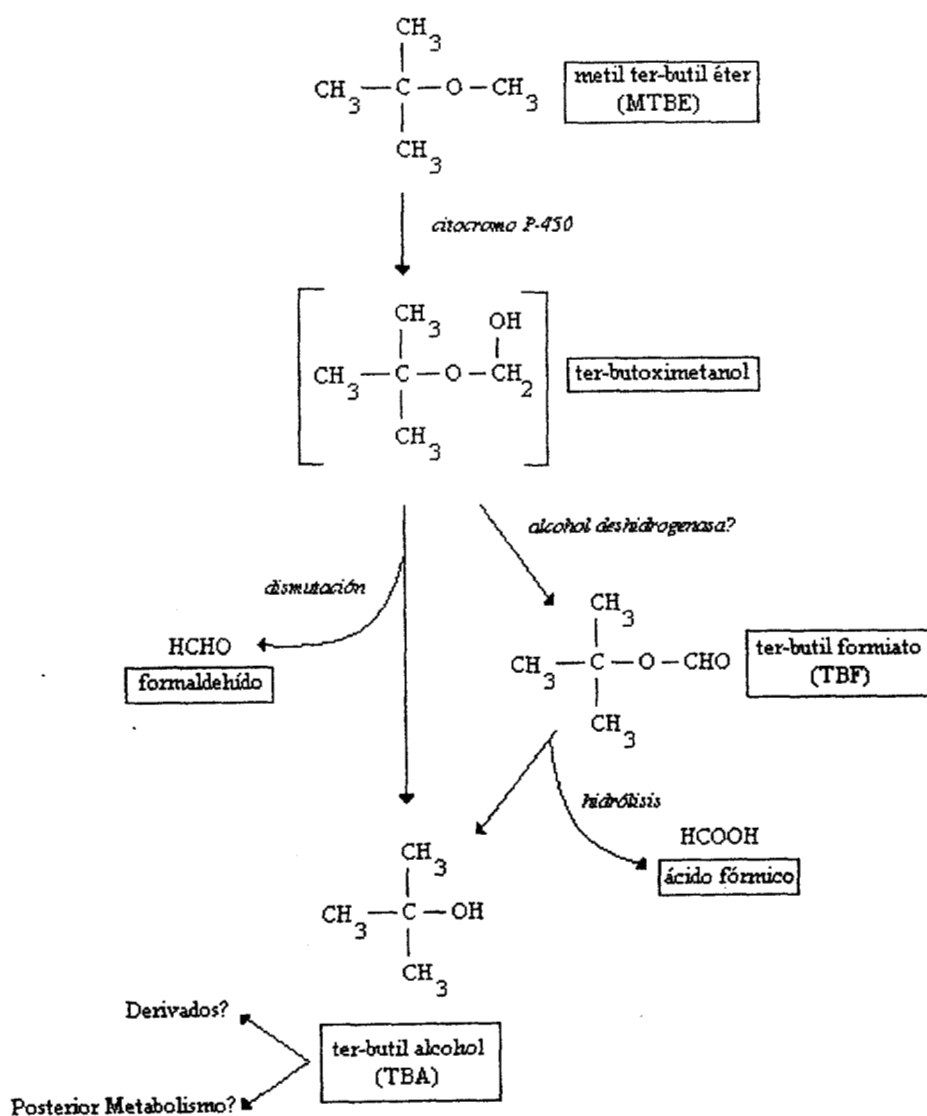


Figura 2.1 Vía propuesta para la degradación cometabólica de MTBE por *Graphium sp.* (Hardison y col. 1997).

Observaron que el MTBE se cometabolizó cuando el hongo creció previamente en n-alcanos o en DEE, pero no se degradó cuando el micelio creció en caldo de Papa-Dextrosa. Basándose en sus resultados, propusieron una vía de degradación cometabólica del MTBE, que involucra ter-butylformiato y ter-butyl alcohol (Figura 2.1).

Steffan y col. (1997) trabajaron con diversas cepas de bacterias capaces de oxidar propano y evaluaron su capacidad de metabolizar oxigenantes de la gasolina, incluyendo el MTBE, el ETBE y el TAME. Sus resultados mostraron que todas las cepas propano-oxidantes probadas degradaron 20 mg/L de MTBE en un rango de velocidades entre 3.9 y 9.2 nmol/min-mg de proteína después de crecer en propano sin un periodo lag significativo. La reacción inicial resultó en la producción de cantidades cercanamente estequiométricas de TBA. Durante la producción de TBA, aproximadamente 25% del carbono añadido del MTBE fue liberado como CO₂, presumiblemente resultado de la oxidación completa del grupo metoxi-metilo de MTBE. Además de las bacterias propano-oxidantes se ensayó la capacidad de oxidación de MTBE de otras bacterias. Una cepa de *Pseudomonas putida* que creció en alcanfor, la cual produce la enzima mono-oxigenasa P-450cam degradó parcialmente MTBE, pero éste no fue degradado cuando la misma cepa creció previamente en medio rico. La degradación de MTBE por esta cepa resultó en la conversión estequiométrica del MTBE añadido a TBA y la concomitante producción de CO₂. El análisis de los productos de degradación de MTBE mostraron la aparición en el medio de cultivo de formaldehído y TBA el cual fue oxidado a 2-metil-2-hidroxi-1-propanol y este al ácido 2-hidroxi isobutírico (HIBA). Ninguno de estos productos fue un sustrato de crecimiento efectivo para las bacterias propano-oxidantes. Los autores proponen sobre la base de sus resultados una vía para la degradación de MTBE por las bacterias propano-oxidantes (Fig. 2.2).

Según Steffan y col. (1997) la degradación de HIBA puede requerir una de tres reacciones como se aprecia en la Figura 2.2: descarboxilación resultando en la formación de 2-propanol (vía 2), deshidratación resultando en la formación de ácido metacrílico (vía 4), o hidroxilación resultando en la formación de ácido 2,3-dihidroxi-2-metil propiónico. Las reacciones de deshidratación (vía 4) y la de hidroxilación (vía 3) podrían potencialmente ser catalizadas por una enzima monooxigenasa P-450.

Kharoune y col. (1997) trataron de obtener microorganismos capaces de degradar eficientemente los oxigenantes de la gasolina: MTBE, ETBE y TAME; e investigaron también la factibilidad de fotodegradación de estos compuestos, ya sea su destrucción parcial o total. Como última meta de este trabajo, combinaron tratamientos microbiológicos y fotoquímicos para obtener una eliminación mas adecuada de estos compuestos.

El tratamiento fotoquímico consistió en tratar las muestras que contenían oxigenantes con radiación ultravioleta combinada con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Sus resultados muestran en cultivos aerobios por lotes una mineralización del ETBE a una velocidad de 4 mg/L·día. En mezclas con otros oxigenantes la velocidad disminuyó a 2 mg/L·día; en la mezcla ETBE-MTBE el último fue degradado a 1.2 mg/L·día y en la mezcla ETBE-TAME el TAME fue degradado a 1.8 mg/L·día. En los experimentos de tratamiento fotoquímico encontraron degradación nula cuando sólo utilizaron H_2O_2 o UV. El tratamiento H_2O_2 /UV tuvo una transformación estable aunque no se logró la completa mineralización. Los intermediarios de la transformación fotoquímica fueron más biodegradables que los oxigenantes. A concentraciones mas bajas de peróxido, el ETBE es transformado pero no mineralizado (los subproductos son acídicos y no absorben en UV), sin embargo aún a la más alta concentración de peróxido la concentración inicial de ETBE no es completamente mineralizada. El alcohol ter-butílico (TBA), el etanol y el metanol fueron los principales subproductos generados de la transformación de ETBE. Los estudios con microorganismos tanto aclimatados como no aclimatados al ETBE degradaron más fácilmente los intermediarios de la transformación fotoquímica del ETBE que a este último.

Eweis y col. (1997) estudiaron la biodegradación de MTBE utilizando un cultivo microbiano mixto proveniente de un biofiltro de la Joint Water Pollution Control Plant (JWPCP) en Carson California.. Los objetivos de su trabajo fueron: 1) investigar la factibilidad de transferencia y mantenimiento de la actividad del cultivo desde un medio sólido (muestras de composta del biofiltro) a un medio líquido, el cultivo líquido sería necesario en el tratamiento biológico de aguas subterráneas contaminadas y 2) determinar los requerimientos nutricionales del cultivo, particularmente en relación al nitrógeno. Se probaron tres medios minerales semejantes en todo excepto en la fuente y/o concentración de nitrógeno: el primero con alta concentración de sales de amonio, el segundo con bajo contenido de amonio y una tercera solución con nitrato de sodio. Sus resultados mostraron que el cultivo fue capaz de degradar MTBE tanto en una matriz sólida como en medio líquido. Por otra parte los microorganismos parecen ser más estables en el medio conteniendo nitrato como fuente de nitrógeno comparado con amonio. El pH. disminuyó como resultado de reacciones de nitrificación al asimilarse el amonio, lo que posiblemente contribuyó a la pérdida de biodegradabilidad en el medio con alta concentración de amonio.

Eweis y col. (1998-a) investigaron el efecto de la presencia de una fuente de carbono más fácilmente degradable sobre la degradación del MTBE. Se seleccionó al tolueno como modelo de los compuestos del grupo BTEX dado que es el compuesto más fácilmente biodegradable de los cuatro aromáticos.

Para estos estudios emplearon un cultivo degradador de MTBE aislado de composta de un biofiltro (Eweis 1997). Los resultados mostraron que el tolueno fue degradado en un 90% en las primeras 6 horas (concentraciones iniciales de 8 y 25 ppm) y que no tuvo un efecto tóxico sobre el cultivo ni tampoco tuvo un efecto de competencia por sustrato sobre el consumo de MTBE, el cual se degradó en más del 95% en 10 semanas a concentraciones de 35 ppm.

Eweis y col. (1998-b) estudiaron la degradación del MTBE en presencia de otros componentes de la gasolina y de otros compuestos oxigenantes por un cultivo mixto (Eweis 1997). Los oxigenantes considerados fueron: TAME, ETBE y DIPE. Entre los componentes de la gasolina estudiados se seleccionaron: al benceno (por su toxicidad) y al tolueno (por ser el más fácil de biodegradar del grupo BTEX) como molécula modelo de los aromáticos. Otros compuestos como el n-hexano se seleccionó como modelo de los n-alcanos y al metil ciclopentano (MCP) como un modelo de los compuestos cíclicos. La presencia de tolueno (20 mg/L) no tuvo un efecto negativo en la degradación del MTBE (10 mg/L). El tolueno se degradó en 2 a 3 días y el MTBE en 4 días. Con el benceno se obtuvieron resultados similares. Aunque el DIPE, ETBE, hexano y MCP no fueron degradados, su presencia en combinación con MTBE no afectó la degradación de éste último. TAME fue el único oxigenante además del MTBE que se degradó. La velocidad de degradación del TAME fue similar a la del MTBE.

Bradley y col. (1999) analizaron la mineralización de MTBE y TBA en muestras de lechos sedimentarios contaminados con gasolina obtenidas de dos lugares distintos. Ambos sitios contenían componentes solubles de gasolinas reformuladas (incluyendo BTEX, MTBE y TBA). Las muestras sedimentarias del primer sitio eran predominantemente aerobias al momento de su colección. Las muestras de agua del segundo sitio fueron aerobias, sin embargo análisis de gases liberados del lecho sedimentario indicaron que era altamente metanogénico. Los microorganismos nativos de los lechos sedimentarios de ambos sitios demostraron mineralización del MTBE a CO₂ (73% para el primer sitio y 30% para el segundo) durante 105 días. En ninguna de las muestras de ambos sitios se observó mineralización significativa de MTBE bajo condiciones estrictamente anaerobias. La velocidad de mineralización bajo condiciones aerobias del segundo sitio fue significativamente menor a la del primer sitio, posiblemente debido a su mayor contenido en materia orgánica, la cual soportó una significativa actividad metanogénica aún bajo un ambiente aerobio (las velocidades calculadas de las gráficas de este trabajo fueron para el primer sitio 1.2 µg/L·día y para el segundo sitio de 0.42 µg/L·día). Los autores argumentan que la baja velocidad de mineralización observada en estos sedimentos puede reflejar una restricción de la mineralización del MTBE a una delgada zona aeróbica en la superficie de los sedimentos.

Hanson y col. (1999-b) lograron aislar una cepa bacteriana pura (bacilo uniflagelado gram-negativo) que denominaron PM1 de composta usada como medio filtrante de un biofiltro. Esta cepa fue capaz de utilizar MTBE como única fuente de carbono y energía a concentraciones tan grandes como 500 μg de MTBE/mL. Las velocidades lineales iniciales de degradación que obtuvieron fueron de 0.07, 1.17 y 3.56 μg de MTBE/mL·hr a concentraciones iniciales del compuesto de 5, 50 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y calcularon un rendimiento de 0.18 mg de células/mg de MTBE. Finalmente, en experimentos de degradación de MTBE en muestras de suelo inoculadas con la cepa PM1 y adicionadas con MTBE encontraron que la cepa consumió fácilmente 20 μg de MTBE/mL, y el organismo permaneció activo en MTBE por 83 h después de su inoculación. De estos experimentos proponen su cepa como un buen candidato para usarse en bioaumentación de sitios contaminados con MTBE.

Acuña-Askar y col. (1999) evaluaron las cinéticas de remoción y la eficiencia de degradación de MTBE en estudios por lotes (concentración inicial de MTBE de 100 mg/L) y en un reactor de flujo continuo (concentraciones iniciales de 150.1, 118 y 143.3 mg/L para tiempos de retención de 0.25, 0.5 y 1.0 días respectivamente) utilizando un cultivo mixto previamente aislado de lodos activados de una planta de tratamiento de aguas residuales de una industria petroquímica. Entre los microorganismos del cultivo mixto aislaron 3 cepas: MC-1 (coco Gram-positivo), MC-2 (*Acinetobacter lwoffii*), y MC3 (*Bacillus sp.*) siendo MC-1 el microorganismo predominante. Para estudios por lotes calcularon mediante un modelo de primer orden, velocidades en el rango de 6.72×10^{-2} a 1.82×10^{-1} /día. Sus experimentos sugieren que la biodegradación de MTBE se inhibe cuando otras fuentes de carbono fácilmente asimilables como el extracto de levadura, están presentes en el medio de cultivo. Los ensayos en el reactor de flujo ascendente continuo con una biopelícula mostraron una biodegradación del MTBE del 70% para tiempos de retención de 0.5 y 1.0 días y proporcionó velocidades de remoción más altas que las obtenidas en estudios por lotes (utilizando un modelo bifásico, la tasa cinética de la primera fase k_1 fue de 43.272 /día y la tasa cinética para la segunda fase k_2 fue de 0.180 /día para el tiempo de retención de 1 día).

Fortin y Deshusses (1999-a) estudiaron la degradación aerobia del MTBE en dos biofiltros de lecho escurrido: uno empacado con roca de lava y el otro con anillos Pall de polipropileno utilizando como inóculo un consorcio microbiano capaz de asimilar el compuesto como única fuente de carbono y energía. El consorcio consistió de al menos seis bacterias Gram positivas y negativas, hongos, protozoarios y rotíferos. Se observó una lenta velocidad de crecimiento y un bajo rendimiento de biomasa y en el estado estacionario alcanzaron para ambos reactores capacidades de eliminación de 42 a 50 $\text{g}/\text{m}^3 \cdot \text{h}$ encontrando que este rango es cercano al reportado para otros compuestos orgánicos volátiles

(VOCs). Al variar las cargas a los reactores obtuvieron eficiencias de remoción hasta 95% a cargas de 15 a 20 g/m³·h. No se encontraron ni en la fase gaseosa ni en el líquido las sustancias reportadas por otros autores como intermediarios del MTBE (TBA y formaldehído) ni tampoco otros posibles subproductos. El cultivo fue capaz de biodegradar TBA a una velocidad similar a la del MTBE. Además el análisis de la relación de carbono recuperado como CO₂ y el carbono alimentado como MTBE muestra recuperación entre el 80 y 120% lo cual indica que la mayor parte del MTBE fue usado para la obtención de energía del cultivo mas que para crecimiento.

Fortin y Deshusses (1999-b) posteriormente realizaron un análisis para poder determinar el paso limitante de la eliminación del MTBE encontrando que en sus reactores la transferencia gas-líquido fue rápida y que la eliminación de MTBE fue predominantemente controlada por fenómenos en la biopelícula. Una comparación detallada de los datos de eliminación de MTBE a diferentes concentraciones de entrada del compuesto a los reactores pero a cargas similares revela que la capacidad de eliminación virtualmente no sufrió cambios por cambios en la concentración. Esto indica que la biodegradación más que la transferencia de masa fue el paso limitante en la biopelícula, ya que tanto la velocidad de difusión y la transferencia de masa líquido-biopelícula son dependientes de la concentración. La observación de una limitación biológica es consistente con el contenido relativamente bajo de biomasa en los reactores y con la relativamente lenta velocidad de biodegradación de MTBE comparada con otros VOC's (capacidades de eliminación del MTBE desde 34.3 hasta 41.6 g/m³·h para concentraciones de entrada desde 0.66 hasta 1.28 g/m³ y tiempos de residencia desde 54 hasta 90 segundos).

Morales y col. (2000) estudiaron la conducta de degradación de MTBE por un consorcio obtenido por enriquecimiento en un filtro de lecho escurrido. Sus experimentos se llevaron a cabo tanto en microcosmos (concentración del MTBE de 25 mg/L) como en columnas de vidrio (concentración de entrada de 12 mg/L). Se realizaron experimentos en condiciones aerobias como anaerobias y se evaluó la capacidad de degradación tanto del consorcio inoculado como de la flora microbiana nativa de muestras de suelo y agua subterránea contaminados con MTBE del sur de California. Sus experimentos mostraron que la degradación de MTBE ocurrió solamente en aquellos microcosmos incubados bajo condiciones aerobias e inoculados con su consorcio. No hubo degradación por los microorganismos nativos o en condiciones anaerobias. En microcosmos obtuvieron la completa degradación (≈100%) de 20-25 mg/L de MTBE en 10 días. Observaron además que cuando debido a la actividad de microorganismos nitrificadores se generaba nitrito, el cultivo sufría una desactivación de la degradación de MTBE y suponen que se debe a una alta sensibilidad de los organismos degradadores de MTBE a este ion. En los estudios en columnas

obtuvieron eficiencias de remoción cercanas al 100% sobre el rango de cargas de MTBE probadas (0.1 – 2.5 g/m³h). La degradación efectiva de MTBE se mantuvo por seis meses.

En el grupo de investigación de la UAM-Iztapalapa, Garnier y col. (2000) estudiaron el cometabolismo de MTBE con gasolina, compuestos que se encuentran en la gasolina: aromáticos (benceno, xileno y tolueno), alcanos cíclicos (ciclohexano), n-alcanos (pentano, hexano, heptano), y compuestos que no se encuentran en la gasolina pero que tienen alguna semejanza estructural con la molécula de MTBE: éteres (Dietil Éter DEE), alcohol ter-butílico, isopropanol, 2,2-dimetil butano (2,2DMB) y 2,2,4-trimetil pentano (2,2,4TMP). Para estos estudios se emplearon consorcios aislados de muestras de suelos contaminados con gasolina. Sus resultados muestran que la gasolina conteniendo aproximadamente 10% de MTBE (mezcla comercial) se mineralizó en un 97% en 6 días. Los compuestos aromáticos se mineralizaron de 2 a 3 días, pero el MTBE no se degradó en las mezclas con estos compuestos. En la mezcla de ciclohexano-MTBE no se observó degradación de ninguno de los compuestos. En las mezclas con los n-alcanos, el MTBE se co-metaboliza con pentano (200 µg/día), con hexano (42 µg/día) y con heptano (87 µg/día). Los n-alcanos se mineralizaron en un 100%. Se encontró además co-metabolismo de MTBE (83 µg/día) con DEE (85% en 17 días). Con TBA no se pudo determinar si hubo degradación. 2,2DMB y 2,2,4TMP no se mineralizaron ni tampoco el MTBE. El alcohol isopropílico se mineralizó en un 100% pero el MTBE prácticamente no se degradó.

Posteriormente Garnier y col. (1999) continuaron los estudios de degradación cometabólica del MTBE bajo condiciones aerobias de cultivo en presencia de pentano ya que con este compuesto se logró la mayor velocidad de degradación cometabólica del MTBE (Garnier y col. 2000). El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar los organismos responsables de la degradación de MTBE a partir de un consorcio capaz de degradar gasolina completamente. Se logró aislar un microorganismo a partir de muestras de suelos de sitios contaminados con gasolina, el cual se identificó por análisis de ácidos grasos como *P. aeruginosa* y actualmente se encuentra depositada en la Colección Nacional de Cultivos Microbianos del CINVESTAV, México, con la clave CDBB-1230. El organismo aislado tiene la habilidad de degradar cometabólicamente MTBE en presencia de pentano, pero no se observó degradación en ausencia del mismo. A partir de datos cinéticos calcularon una velocidad máxima de crecimiento en pentano de 0.19 h⁻¹ además determinaron las constantes de saturación real ($K_s=2.9 \mu\text{g/l}$) e inhibitoria ($K_i= 3.5 \text{ mg/l}$) para el pentano. La relación entre K_s para el MTBE (185 mg/l) y el K_s para el pentano (2.9 µg/L) fue calculada en 64,000, y consideran por lo tanto que las enzimas involucradas en el proceso tienen una mucho más alta afinidad por el pentano que por el MTBE. En otros estudios

cinéticos observaron inhibición competitiva entre MTBE y Pentano. Finalmente, no se observó un efecto inhibitorio significativo sobre *P. aeruginosa* con una concentración de MTBE de hasta 900 mg/l.

También en el grupo de investigación de la UAM, Dupasquier y col. (1999) llevaron a cabo estudios de degradación de vapores de MTBE por cometabolismo con pentano usando la cepa de *P. aeruginosa* CDBB-1230 aislada por Garnier y col (1999-b). Los experimentos se realizaron en un biofiltro de 2.4 litros empacado con un soporte mineral (vermiculita). Sus resultados comprueban la degradación cometabólica del MTBE en presencia de pentano observada por Garnier. La capacidad de eliminación experimental del pentano fue de $7 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ a un tiempo de residencia de 1.1 horas y una concentración de entrada de $18 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$, mientras que para el MTBE la capacidad de eliminación fue entre 0.3 y $0.7 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ a concentraciones de entrada entre 1 y $11 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$. Para ambos productos, encontraron una relación lineal entre la concentración y la altura del biofiltro y concluyen que esta conducta indica que las velocidades de degradación de MTBE y pentano estuvieron limitadas por la reacción biológica. El modelo matemático que utilizaron, predijo satisfactoriamente los perfiles de concentración de pentano y MTBE con la altura del biofiltro. Por otra parte, se observó que la eficiencia de remoción del pentano decrece con incrementos en la concentración de entrada de MTBE y explican este fenómeno como una inhibición de la degradación de pentano por MTBE.

En los trabajos anteriores podemos apreciar que los estudios en condiciones aerobias proporcionan mejores resultados de degradación del MTBE que los anaerobios. Por otra parte, si bien el aislar cepas puras o consorcios capaces de utilizar al oxigenante como única fuente de carbono y energía es de gran interés dada la enorme dificultad de degradación de este compuesto en la naturaleza, la degradación cometabólica también resulta ser una buena alternativa para el control del MTBE en sitios contaminados. El poder entender el fenómeno de cometabolismo de un compuesto como el MTBE nos ayudaría a plantear estrategias de biorremediación de esta sustancia y otras relacionadas como el ETBE y el TAME entre otras.

En el presente trabajo se reportan la obtención de consorcios y el aislamiento de cepas bacterianas puras capaces de biodegradar en condiciones aerobias, por co-metabolismo, al MTBE en presencia de gasolina y de pentano respectivamente. Además, se muestran experimentos en los que se utilizaron algunos compuestos con una estructura molecular análoga a la del oxigenante con el fin de investigar si los microorganismos estudiados podían emplearlos como sustratos de crecimiento y en tal caso si permitían la degradación cometabólica del MTBE.

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS.

GENERAL

Contribuir al estudio de la biodegradación aerobia del compuesto oxigenante de la gasolina metil *ter*-butil éter (MTBE) utilizando cultivos bacterianos puros y consorcios, ya sea por cometabolismo o como única fuente de carbono y energía a nivel de microcosmos.

PARTICULARES

1. Obtener por enriquecimiento consorcios bacterianos capaces de metabolizar o de co-metabolizar MTBE en un cultivo aerobio líquido.
2. Aislar y caracterizar cepas bacterianas puras en base a su capacidad para asimilar al MTBE como única fuente de carbono y energía o de degradar la molécula por co-metabolismo en presencia de análogos de esta sustancia que sirvan como sustratos de crecimiento.
3. Estudiar la cinética de degradación co-metabólica de MTBE en un medio aerobio líquido (microcosmos) con consorcios bacterianos y cepas puras, utilizando como sustratos de crecimiento compuestos con semejanza estructural a la molécula de MTBE tales como dietil éter y los alcoholes isobutílico, secbutílico, terbutílico (TBA) e isoamílico.
4. Obtener parámetros cinéticos que describan el co-metabolismo de MTBE con los sustratos antes mencionados y que permitan comparar las capacidades de biodegradación de los cultivos así como los sustratos ensayados en función de la degradación del MTBE.

CAPÍTULO IV

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 Inóculos

Los microorganismos utilizados en este trabajo fueron obtenidos de las siguientes fuentes:

- De un biofiltro alimentado con pentano y MTBE de la Planta Piloto (PPU4) del grupo de tratamiento de Emisiones Gaseosas (Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica) de la UAM-I (Dupasquier, 1999), se obtuvo un consorcio (P), que se mantuvo en medio de sales minerales (MSM) con pentano como única fuente de carbono y energía. De este consorcio se aislaron varias cepas puras inoculando 1 mL del caldo de cultivo en placas Petri con medio MSM con agar purificado, incubadas a 30°C dentro de un desecador con atmósfera de pentano. La cepa que mostró la mayor velocidad de degradación de pentano, fue identificada por tinción de Gram y por análisis de ácidos grasos (FAME) por Analytical Services Inc. (Williston, Vt., USA) como *Pseudomonas aeruginosa* y depositada en la Colección Nacional de Cultivos Microbianos, (CINVESTAV, México) bajo el número CDBB-B-1230 (Garnier 1999).
- Una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (CDBB-B-999) adquirida en la Colección Nacional de Cultivos Microbianos, (CINVESTAV, México)
- Una cepa de *Pseudomonas sp.* (Ps) con capacidad de crecer en hidrocarburos de cadena larga (cepa Ps) aislada de una muestra de suelo en la Escuela de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (IPN, México).
- Dos consorcios (denominados respectivamente consorcios T1 y T2) obtenidos en el laboratorio de emisiones gaseosas (UAM) en 1997 por enriquecimiento con gasolina de sendas muestras de suelo contaminado con el mismo combustible. Las muestras de suelo fueron proporcionadas por el Instituto Mexicano del Petróleo (IMP, México).
- Un cultivo mixto (consorcio M) obtenido al mezclar cuatro cepas puras sin identificar, aisladas de diferentes biofiltros de la Planta Piloto PPU4 del grupo de tratamiento de Emisiones Gaseosas (Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, IPH) de la UAM-I en diferentes épocas, alimentados con distintos hidrocarburos. Este consorcio se enriqueció en medio MSM con gasolina con recambio semanal de medio.

Antes de ser utilizados como inóculos de los sistemas experimentales, los diferentes grupos microbianos fueron enriquecidos en matraces Erlenmeyer de 250 mL con tapón roscado conteniendo 100 mL de MSM (ver Tabla 4.1) con los distintos compuestos a ensayar como la única fuente de carbono y energía.

Una vez que los cultivos alcanzaron una densidad óptica mínima de 0.4 (a 540 nm), la biomasa se concentró por centrifugación a 10,000 r.p.m. a 10°C; se desechó el sobrenadante y se resuspendió en medio fresco o solución salina estéril (0.85% de NaCl), se centrifugó nuevamente y se desechó el sobrenadante. El proceso se repitió dos veces con el fin de “lavar” las células. La biomasa resultante se resuspendió en medio fresco hasta lograr una densidad óptica de 0.2 tal como se explica en la sección de microcosmos.

4.2 Reactivos.

Metil *t*-butil éter (98%, $\rho = 0.740 \text{ g/cm}^3$), pentano (99%, $\rho = 0.626 \text{ g/cm}^3$), alcohol isoamílico (3-metil-1-butanol, 99%, $\rho = 0.809 \text{ g/cm}^3$) y *t*-butil alcohol (99%, $\rho = 0.77 \text{ g/cm}^3$) fueron de Aldrich Chemicals (Milwaukee, Wis. EE.UU.); dietil éter (99.9%, $\rho = 0.713 \text{ g/cm}^3$) de J.T. Baker (Xalostoc, México), alcohol sec-butilico (2-butanol, 99.5%, $\rho = 0.81 \text{ g/cm}^3$) y alcohol isobutílico (isobutanol, 99%, $\rho = 0.80 \text{ g/cm}^3$) de Merck (Darmstadt, Alemania). La gasolina fue Magna SIN (de PEMEX, adquirida en México D.F. $\rho = 0.7425 \text{ g/cm}^3$ a 20 °C determinada con un picnómetro)

4.3 Cuantificación de la biomasa

La biomasa se determinó indirectamente mediante la medición de densidad óptica a una longitud de onda de 540 nm (DO_{540}) (Duetz y col., 1994; Steffan y col., 1997) en un espectrómetro Spectronic 20D (Milton Roy Company, U.S.A.) en celdas de vidrio de 10 cm de longitud. Como blanco se utilizó medio de cultivo (Sección 4.4)

Posteriormente se realizaron mediciones de proteína por el método de Lowry (Lowry, 1951) a muestras de los cultivos con densidades ópticas conocidas con el fin de determinar la equivalencia entre DO_{540} y contenido de proteína. En consecuencia la biomasa en este trabajo se reporta indirectamente como contenido de proteína.

4.4 Medio de cultivo.

Se utilizó un medio de cultivo de sales minerales (MSM, Acuña y col. 1999) modificado (Tabla 4.1). La fuente de hierro fue sustituida por cloruro férrico que es más soluble (Dean, 1989) y además se adicionaron elementos traza cuya formulación se modificó de Meynell y col. (1970). Se omitió la fuente de cobre para prevenir una inhibición potencial de enzimas de tipo monooxigenasas (Phelps y col. 1992), posibles responsables de la degradación de MTBE (Hardison y col., 1997; Steffan y col., 1997).

TABLA 4.1 MEDIO DE SALES MINERALES (MSM) MODIFICADO DE ACUÑA Y COL., 1999; ELEMENTOS TRAZA MODIFICADO DE MEYNELL Y COL., 1970)

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN g/L	SOLUCIÓN DE ELEMENTOS TRAZA	
		COMPUESTO	CONCENTRACIÓN g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.00	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.2000
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.50	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.4400
KH ₂ PO ₄	0.60	MnSO ₄ ·H ₂ O	0.8411
K ₂ HPO ₄	2.40	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.2621
CaSO ₄	0.15	H ₃ BO ₃	0.0620
Solución Elementos Traza	5 mL	NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.0900
pH	6.8-7.0	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.4900

4.5 Microcosmos.

Los estudios cinéticos de descomposición de MTBE se realizaron por el método de microcosmos utilizado por Garnier y col. (1999), usando botellas serológicas de 125 mL conteniendo 20 mL de MSM (Figura 4.1) inoculado con el (los) microorganismo(s) a ensayar hasta alcanzar una DO₅₄₀ de 0.2. Las botellas fueron selladas con válvulas de teflón Minniner[®].

Se investigó la degradación del MTBE como única fuente de carbono y por cometabolismo con gasolina ya que es en este combustible donde se encuentra el MTBE; además se estudió el cometabolismo con sustancias análogas a la molécula de MTBE.

En la Figura 4.1 se muestran las fórmulas del MTBE, y de los análogos estudiados: TBA, Isobutanol, secbutanol, alcohol isoamílico y dietil éter.

225556

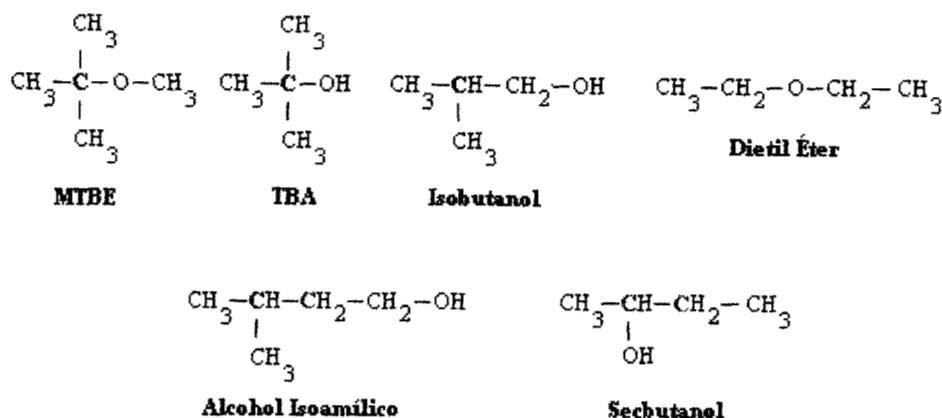


Figura 4.1 Estructura molecular del MTBE y algunos análogos utilizados en los experimentos de cometabolismo. Los carbonos en rojo indican un carbono terciario y en verde un carbono secundario

En estos últimos experimentos, se utilizó como sustrato de referencia al pentano, por ser un compuesto de fácil asimilación para los microorganismos estudiados y que permite la degradación cometabólica del MTBE.

Cada experimento consistió de las siguientes unidades experimentales:

- Una botella adicionada con 5 μL de MTBE, agregados mediante una jeringa Hamilton[®] (Reno, Nevada. EE.UU.) de 10 μL de capacidad.
- En el caso de los estudios de cometabolismo una segunda botella con 5 μL de MTBE más 5 μL del sustrato a probar (mencionados arriba) como fuente de carbono y energía.
- Una tercer botella con 5 μL del sustrato.
- Y una cuarta botella sin ninguna fuente de carbono para determinar la respiración endógena del cultivo.

Cada experimento se hizo por duplicado. Las botellas se incubaron a 30 °C con agitación rotatoria (150 rpm).

4.6 Análisis cromatográfico

Las mediciones del consumo de los sustratos, del consumo de oxígeno y formación de bióxido de carbono se realizaron tomando periódicamente (aproximadamente cada 24 horas) muestras de 100 μL de la fase gaseosa de cada



Figura 4.2 Microcosmos en botellas serológicas de 125 mL conteniendo 20 mL de medio de sales minerales e inoculadas con el microorganismo a estudiar hasta alcanzar una densidad óptica a 540 nm de 0.2 de absorbancia. Las botellas fueron cerradas herméticamente con válvulas de teflón Minniner®.

frasco (headspace) con una jeringa para gases (Precision sampling[®], Rouger, Louisiana) de 0.5 mL de capacidad y analizadas por cromatografía de gases FID y TCD. En el caso de los compuestos poco volátiles como el isobutanol fue necesario inyectar una mayor cantidad de muestra (0.5-1.0 mL) para poder detectarlos.

Cada medición se hizo por duplicado. La lectura proporcionada por el cromatógrafo (área bajo la curva) se convirtió a volumen (microlitros) de compuesto mediante curvas estándar (ver Sección 4.7).

La concentración del MTBE y de los diferentes sustratos ensayados se determinó en un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard, U.S.A.), modelo 5890 serie II con un detector de ionización de flama (FID). La columna utilizada fue de metil silicón de 30 m de longitud, diámetro interno de 0.32 mm y película de 0.25 μm (Quadrex Corporation, U.S.A.). Como gas acarreador se usó nitrógeno (Praxair, México) a una velocidad de flujo de 1.6 mL/min. Las temperaturas de trabajo fueron: inyector 180°C, columna 50°C, detector 210°C.

En el caso de la medición de gasolina la temperatura de la columna se mantuvo a 40°C durante 2.5 minutos y después se hizo una rampa hasta 120°C (70°C/min).

Para la determinación de la concentración de O₂ y de CO₂ se utilizó un cromatógrafo de gases GOW MAC (serie 550 con un detector de conductividad térmica, con una columna concéntrica CTR-1, Alltech, USA) con helio (Praxair, México) como gas acarreador a una velocidad de flujo de 65 mL/min. Las temperaturas de operación fueron: inyector 30 °C, detector 70 °C y columna 30 °C.

4.7 Curvas estándar

Para cuantificar el MTBE y los demás sustratos probados se hicieron curvas estándar:

En 10 botellas conteniendo cada una 20 mL de MSM (similares a las utilizadas en los experimentos pero sin inocular) se adicionaron cantidades conocidas crecientes del compuesto a cuantificar, y se analizaron por cromatografía de la misma forma que las unidades experimentales. Los datos de área bajo la curva determinados en el cromatógrafo y el volumen del compuesto añadido a cada frasco siguieron una relación lineal pudiéndose por lo tanto ajustar por medio de análisis de mínimos cuadrados. Los coeficientes de regresión fueron en general superiores a 0.990.

El volumen de cada compuesto estudiado así calculado, se transformó mediante su densidad a masa (mg), que es en la forma en la que se reportó en este trabajo.

4.8 Análisis de regresión de los datos experimentales

Los datos cinéticos de la degradación de los compuestos se ajustaron mediante el modelo de Gompertz (Acuña y col., 1999), una función matemática con una doble exponencial explicada con mayor detalle en el Apéndice A:

$$Y = \alpha \exp(-\beta \exp^{-kx}) \quad (4.1)$$

La velocidad máxima $V_{\text{máx}}$ (la máxima razón de cambio de la variable Y con respecto a la variable x), puede ser calculada de los parámetros del modelo como $V_{\text{máx}} = 0.368\alpha k$ (ver Apéndice A). En este trabajo la velocidad máxima de degradación se expresa en mg de sustrato/unidad experimental·h. Al conocer el contenido de proteína en cada unidad experimental (ver *Cuantificación de biomasa*, Sección 4.3), podemos expresar $V_{\text{máx}}$ en términos de mg de compuesto/mg prot·h. Para poder realizar el ajuste de los datos experimentales con el modelo de Gompertz, se utilizó el programa de cómputo KaleidaGraph™ versión 3.08 de Synergy Software.

4.9 Coeficiente cometabólico

Para cuantificar el cometabolismo del MTBE en presencia de un sustrato, en éste trabajo se define un coeficiente cometabólico "CC" como la masa de MTBE cometabolizado por unidad de masa de sustrato degradado, calculado en las fases asintóticas de degradación, ya que en estas fases se obtiene la degradación máxima de cada compuesto. Este coeficiente puede calcularse con los parámetros de ajuste α del modelo de Gompertz (Apéndice A) para el MTBE y para el sustrato empleado según el experimento: ya que α (mg de sustancia/unidad experimental) es la máxima cantidad de sustancia degradada:

$$CC = \frac{\alpha_{\text{MTBE}}}{\alpha_{\text{sustrato}}} \left(\frac{\text{mg MTBE}}{\text{mg sustrato}} \right) \quad (4.2)$$

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

A la fecha existen pocos reportes de microorganismos capaces de utilizar al metil ter-butil éter (MTBE) como única fuente de carbono y energía. A pesar de la dificultad de encontrar microbios con tal habilidad y precisamente debido a ello, se realizaron esfuerzos con el afán de encontrar algún consorcio o alguna cepa bacteriana pura capaz de metabolizar a este importante aditivo oxigenante de las gasolinas usadas actualmente. Quizás de mayor importancia en la naturaleza, existe una forma alterna de biodegradación del MTBE: la degradación cometabólica, objeto principal de estudio del presente trabajo para lo cual se investigó la capacidad de los microorganismos estudiados de utilizar como sustratos de crecimiento varios compuestos con semejanza estructural a la molécula de MTBE así como su potencial para inducir la degradación cometabólica del MTBE.

En la primera sección de este capítulo se reportan los resultados de los estudios con consorcios: cinéticas de degradación cometabólica del MTBE utilizando como sustratos los compuestos volátiles de la gasolina. En la segunda sección se muestran los resultados de los trabajos con algunas cepas puras obtenidas de uno de los consorcios: aislamiento y cinéticas de cometabolismo. Finalmente, en la tercera sección se hace referencia a los estudios de degradación cometabólica con los diferentes sustratos propuestos, utilizando los cultivos seleccionados en los estudios anteriores.

5.1 Degradación de MTBE por consorcios.

5.1.1 Degradación como única fuente de carbono.

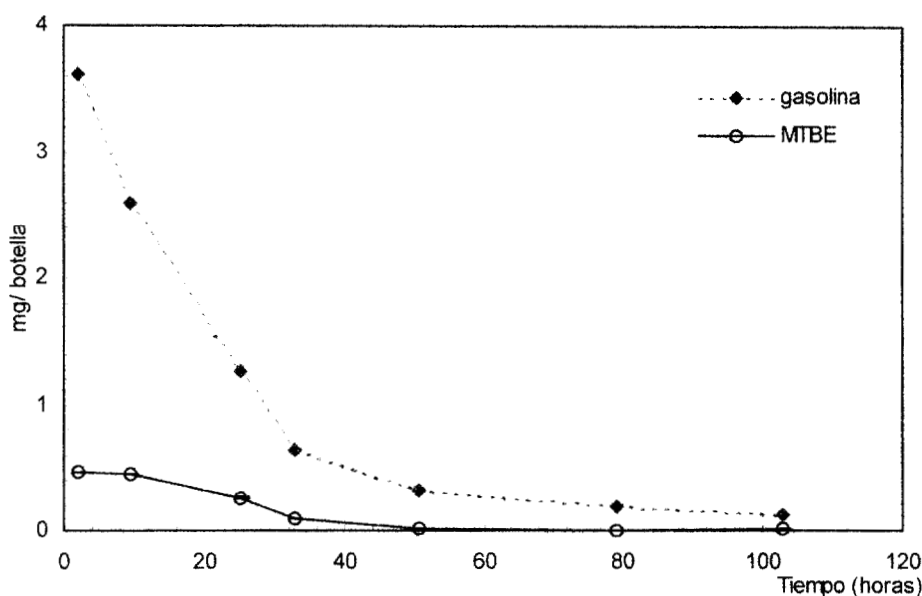
Tal como se mencionó en el capítulo de *Materiales y métodos*, se contó con cuatro consorcios: P, M, T1 y T2 que fueron evaluados en cuanto a su capacidad de crecer en MTBE como única fuente de carbono y energía. Después de aproximadamente un mes de cultivo en MSM con MTBE (25 μ L/100 mL de medio), el crecimiento en los cuatro consorcios, monitoreado por D.O.₅₄₀ fue nulo. Así mismo, la cinética de degradación en microcosmos no mostró la desaparición del compuesto (datos no mostrados), por lo que se decidió continuar los estudios por vía cometabólica.

5.1.2 Cinéticas de degradación de MTBE por los consorcios con gasolina.

Como compuesto inicial para estos análisis se usó gasolina ya que tres de los cuatro consorcios se habían enriquecido en este combustible y el MTBE liberado

al ambiente normalmente se encuentra asociado a éste. También el consorcio P (hasta el momento enriquecido en pentano) se enriqueció en gasolina previamente a los experimentos de cometabolismo.

Una vez que se obtuvieron los datos experimentales de degradación, se analizaron mediante el modelo de Gompertz descrito en el apéndice A. La forma en la que se utilizó el modelo en este trabajo se ilustra con un ejemplo de degradación de gasolina usando como inóculo al consorcio P (Gráfica 5.1).



Gráfica 5.1. Degradación de gasolina Magna SIN y MTBE por el consorcio P durante 100 horas de cultivo.

Antes de poder utilizar el modelo de Gompertz para modelar los datos experimentales, es necesario transformarlos: estimar para cada punto experimental la cantidad de sustrato **consumido** mediante el siguiente cálculo:

$$S_c = (S_0 - S) \quad (5.1)$$

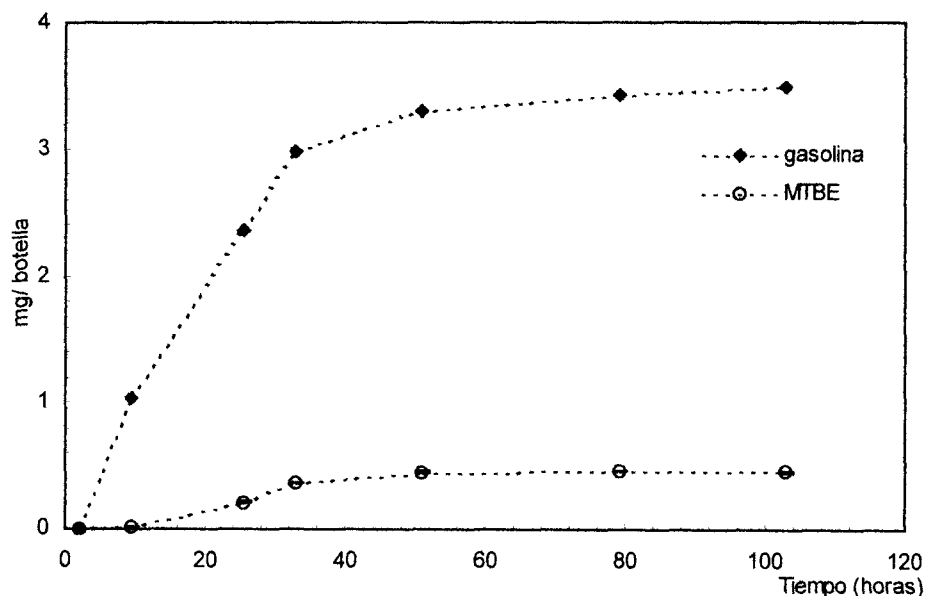
Donde:

S_c es la cantidad de sustrato consumido

S_0 es la cantidad inicial de sustrato en cada unidad experimental

S es la cantidad de sustrato presente al momento de la medición.

En la Gráfica 5.2 se muestran los datos transformados:



Gráfica 5.2. Consumo de MTBE y gasolina por el consorcio P. Datos transformados para su análisis por el modelo de Gompertz.

Después de aplicar el análisis de regresión con el modelo de Gompertz, se obtuvieron los siguientes coeficientes:

para la gasolina:

$$\alpha = 3.4471$$

$$b = 3.2565$$

$$k = 0.0940$$

Con un coeficiente de determinación $r^2 = 0.9901$

para el MTBE:

$$\alpha = 0.4633$$

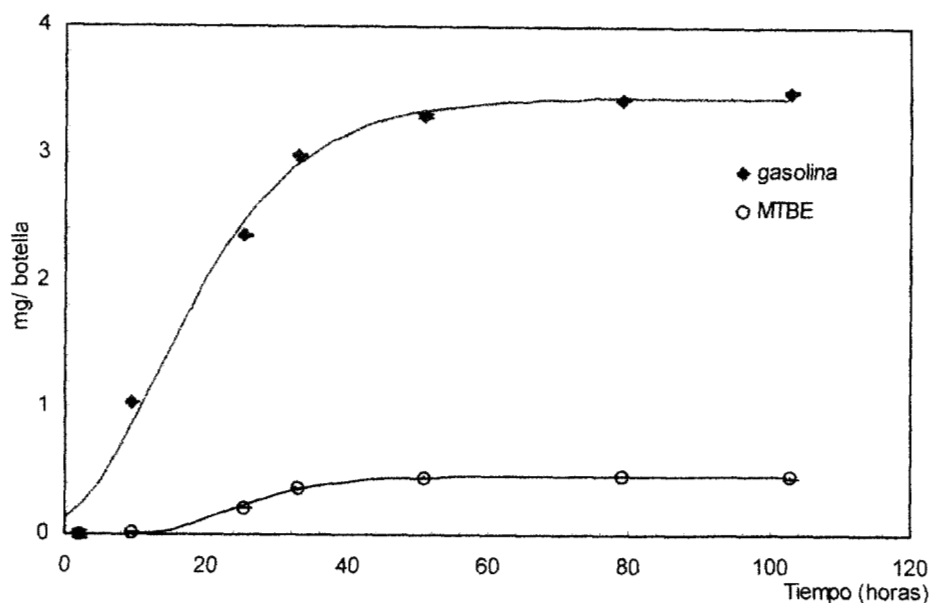
$$b = 17.321$$

$$k = 0.1281$$

Con un coeficiente de determinación $r^2 = 0.9948$

En la Gráfica 5.3, se muestran los datos experimentales de degradación de MTBE y gasolina, con los respectivos ajustes obtenidos por el modelo de Gompertz.

225553



Gráfica 5.3. Consumo de gasolina y MTBE. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas los ajustados por el modelo de Gompertz.

A continuación, haciendo uso nuevamente de la relación $S_c = (S_0 - S)$, se calculó para cada momento, la cantidad estimada (ajustada) de los sustratos presentes. Las cantidades experimentales y las ajustadas se muestran en la Gráfica 5.4.

Los modelos ajustados quedan

para la gasolina:

$$S_c = 3.4471 \exp(-3.2565 \exp^{0.0904*t}) \quad (5.2)$$

para el MTBE:

$$S_c = 0.4633 \exp(17.321 \exp^{0.1281*t}) \quad (5.3)$$

Y las velocidades máximas:

$$V_{m\acute{a}x} = 0.1150 \text{ mg de gasolina/unidad experimental}\cdot\text{h}$$

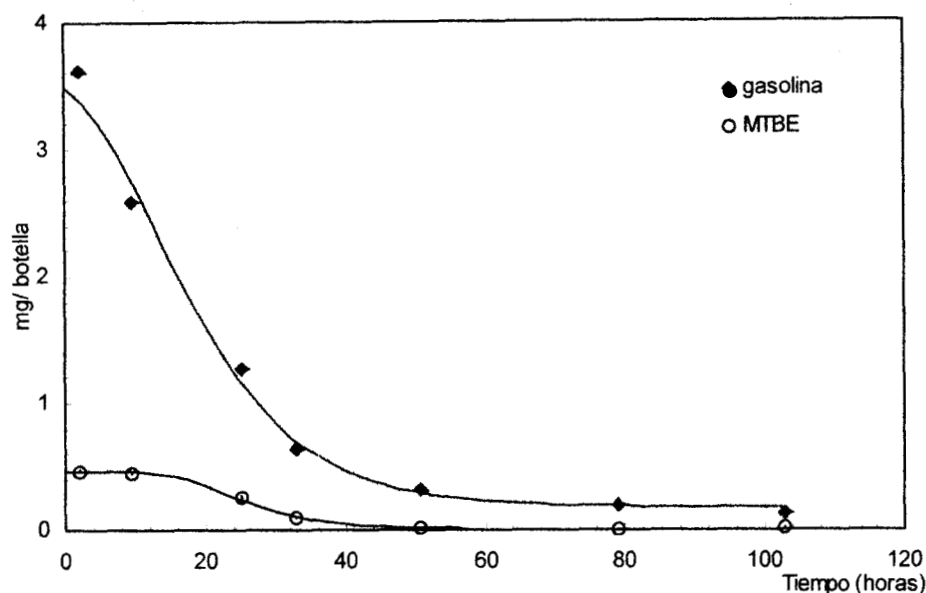
$$V_{m\acute{a}x} = 0.0218 \text{ mg de MTBE/unidad experimental}\cdot\text{h}$$

De las mediciones realizadas para correlacionar la densidad óptica y proteína se encontró que para una D.O. igual a 0.2, el contenido de proteína fue de 1115 μg . En consecuencia los datos de velocidades máximas de consumo se reportan

en este trabajo como miligramos de sustrato consumido por hora por miligramos de proteína.

$$V_{\text{máx}} = 0.103 \text{ mg de gasolina/mg de Proteína}\cdot\text{h}$$

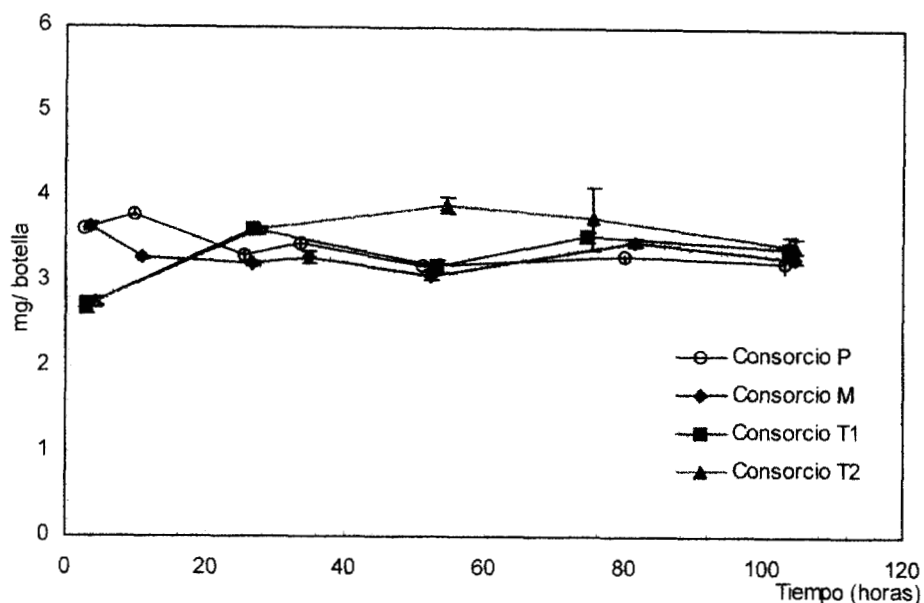
$$V_{\text{máx}} = 0.020 \text{ mg de MTBE/mg de Proteína}\cdot\text{h}$$



Gráfica 5.4. Datos experimentales y ajustados de la degradación de gasolina comercial Magna SIN y del MTBE por el consorcio P.

La Gráfica 5.5 muestra que ninguno de los cuatro consorcios estudiados fueron capaces de utilizar al MTBE como sustrato de crecimiento. Durante un periodo de 100 horas de cultivo, la concentración del oxigenante permaneció prácticamente sin cambio. Este resultado coincide con varios reportes que señalan la dificultad de degradación del MTBE: Salanitro y col. (1994), Horan y Brown (1995), Hardison y col. (1997), Garnier y col. (1999, 2000).

En consecuencia se estudió la degradación cometabólica del oxigenante con gasolina Magna SIN.

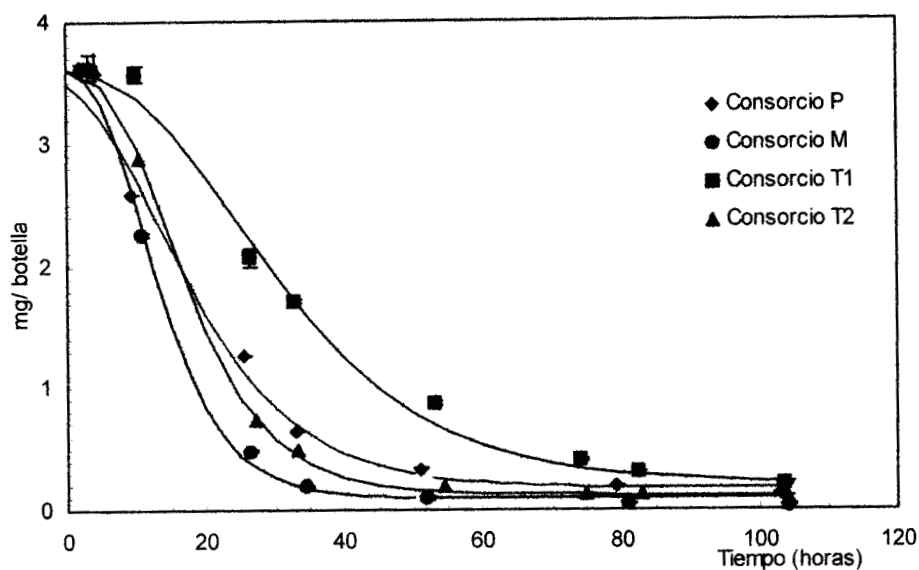


Gráfica 5.5. Evolución de la concentración de MTBE como único sustrato de crecimiento para los cuatro consorcios bacterianos estudiados.

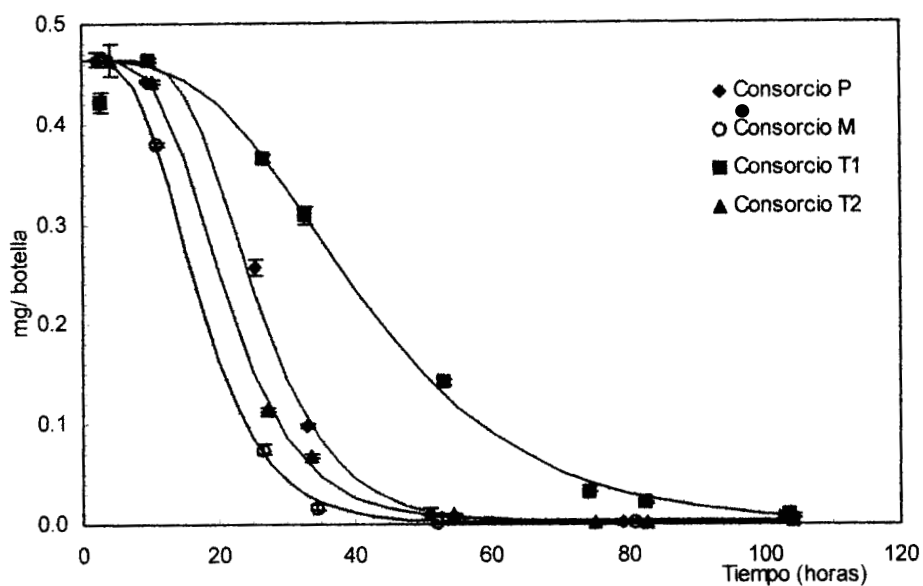
La gráfica 5.6 muestra las cinéticas ajustadas para la degradación de gasolina por los cuatro consorcios estudiados. Puede apreciarse que desde las 50 horas de cultivo tres de los cuatro consorcios degradaron más del 90% de la concentración inicial de la gasolina (5 μ L/botella) sin embargo después de 100 horas de cultivo los cuatro consorcios lograron una degradación semejante (alrededor de 95%). En la Gráfica 5.7 se muestra que el comportamiento de degradación del MTBE contenido en la gasolina (aproximadamente 0.6 μ L/botella) fue muy similar al de la gasolina: tres consorcios lograron degradar más del 90% del MTBE alrededor de las 40 horas de cultivo y los cuatro lo degradan alrededor del 99% a las 100 horas.

Los resultados anteriores indican que la degradación del MTBE es por vía cometabólica con alguno o algunos de los compuestos de la gasolina.

Estos datos están de acuerdo con los reportados por Garnier y col. (2000), que encontraron la degradación total de gasolina y la degradación cometabólica del MTBE; pero cuando probaron compuestos específicos de la gasolina, no obtuvieron cometabolismo del MTBE con aromáticos (BTEX), solamente con hidrocarburos alifáticos como pentano, hexano y heptano. Sin embargo los consorcios enriquecidos en este trabajo fueron más rápidos que el consorcio de Garnier y col. Que degradaron el 97% de la gasolina hasta los 6 días (144 horas) de cultivo.



Gráfica 5.6. Degradación de vapores de gasolina Magna SIN por 4 consorcios bacterianos.



Gráfica 5.7. Degradación cometabólica de MTBE con gasolina Magna SIN por los consorcios bacterianos estudiados.

En la Tabla 5.1 se resumen las velocidades máximas de degradación de los compuestos volátiles (30°C) de la gasolina comercial Magna SIN y del MTBE contenido en ese tipo de gasolina calculadas con el procedimiento antes explicado (Gompertz). También se muestran los porcentajes de degradación

determinados a las 100 horas de cultivo y el coeficiente cometabólico CC (sección 4.9, capítulo *Materiales y métodos*) que indica la cantidad de MTBE degradado por unidad de sustrato consumido.

Tabla 5.1 Datos cinéticos de degradación de gasolina Magna SIN después de 100 horas de cultivo.

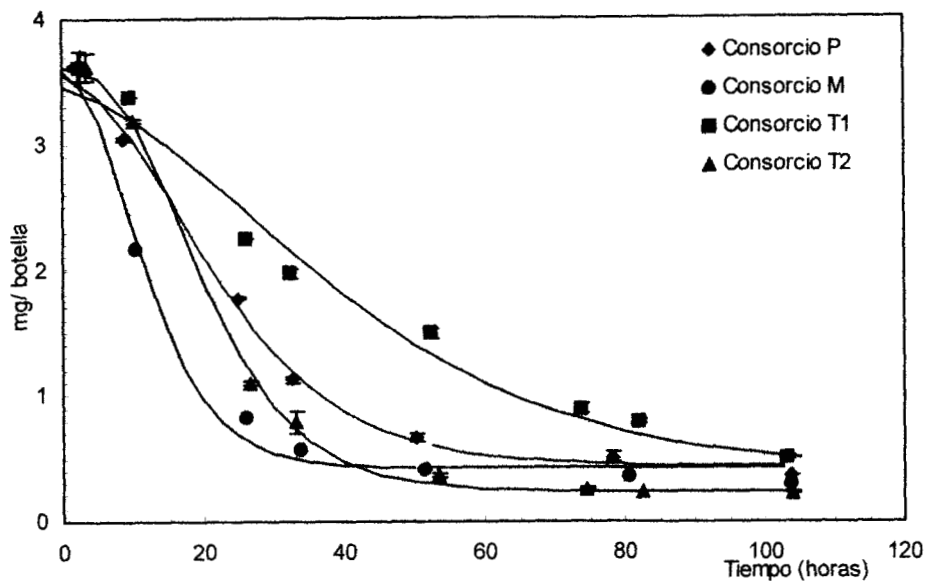
Microorganismo	V _{máx}		% degradación Gasolina	% degradación MTBE	CC mg MTBE/mg gasolina
	Gasolina mg/mg prot·h (R ² del ajuste)	MTBE mg/mg prot·h (R ² del ajuste)			
Consorcio P	0.103±0.020 (0.990)	0.020±0.006 (0.995)	94.9	99.8	0.134
Consorcio M	0.182±0.034 (0.996)	0.023±0.002 (0.999)	97.5	99.7	0.131
Consorcio T1	0.074±0.012 (0.993)	0.009±0.001 (0.999)	93.4	97.7	0.136
Consorcio T2	0.144±0.011 (0.998)	0.021±0.001 (0.999)	96.6	99.2	0.132

Intervalos de confianza del 95% para V_{máx}.

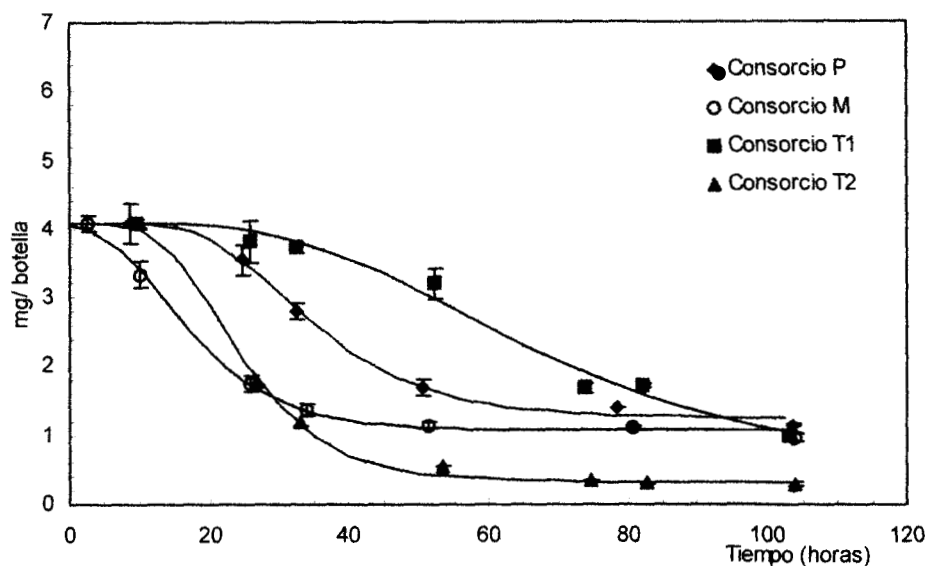
En esta Tabla se observa que tres de los cuatro consorcios: P, M y T2 mostraron velocidades máximas de degradación de MTBE alrededor de 0.02 mg/h·mg proteína, porcentajes de degradación de MTBE superiores al 99% y porcentajes de degradación de gasolina alrededor del 95%. Los consorcios M y T2 fueron los más rápidos para degradar gasolina y el consorcio T1 fue el más lento para degradar tanto gasolina como MTBE. Sin embargo, al final de 100 horas de cultivo degradó cantidades de gasolina y MTBE cercanas a los otros tres consorcios. Al analizar el coeficiente cometabólico puede observarse que en estos experimentos los cuatro consorcios fueron bastante similares degradando alrededor de 0.13 mg de MTBE/mg de gasolina consumida. Puede verse, por lo tanto, que aunque los cuatro consorcios estudiados provienen de fuentes diferentes, tras un periodo de enriquecimiento en gasolina, todos pudieron consumir el combustible y degradar cometabólicamente al MTBE de forma muy parecida.

Se evaluó el posible efecto inhibitorio del MTBE sobre la degradación de los compuestos volátiles de la gasolina incrementando la cantidad de MTBE mediante la adición externa del oxigenante (a un microcosmos con 5 µL de gasolina Magna SIN se agregaron 5 µL de MTBE puro).

La Gráfica 5.8 muestra las cinéticas ajustadas para la degradación de gasolina adicionada con MTBE exógeno por los cuatro consorcios estudiados y la Gráfica 5.9 la degradación cometabólica del MTBE total presente en cada microcosmos.



Gráfica 5.8. Degradación de la gasolina comercial Magna SIN adicionada con MTBE exógeno.



Gráfica 5.9 Degradación cometabólica de MTBE. Efecto del incremento de la concentración del oxigenante en la Gasolina Magna SIN.

Al comparar las cinéticas de degradación del MTBE cuando se incrementa la cantidad del oxigenante en una gasolina comercial (Gráfica 5.9) contra la degradación del mismo en la gasolina intacta (Gráfica 5.6), observamos que en condiciones similares de cultivo, los microcosmos alimentados con gasolina sin adición de MTBE pudieron degradar por completo a este último compuesto mientras que en los microcosmos con adición extra de MTBE no se logró la

degradación total del oxigenante. Lo anterior puede ser explicado debido a que alrededor de las 50 horas de cultivo, la degradación de la gasolina había cesado para tres de los cuatro consorcios estudiados y como recordaremos de la definición de cometabolismo, la degradación del cometabolito, en este caso el MTBE solo se presenta cuando existe degradación de un sustrato de crecimiento (gasolina). Cuando cesa el consumo de los compuestos de la gasolina, también se detiene la degradación del MTBE.

En la Tabla 5.2 se observan que si hubo diferencias en la degradación de las sustancias probadas por la adición de MTBE exógeno, es decir, se encontró un efecto significativo de inhibición en la degradación de los compuestos de la gasolina al incrementar la concentración de MTBE. Aunque se observa un menor porcentaje de degradación de MTBE en los experimentos con adición exógena, la cantidad degradada del oxigenante fue mayor ya que las unidades experimentales contenían alrededor de nueve veces más MTBE (5.6 μ l/botella) que en los microcosmos sin adición. La cantidad de gasolina en los experimentos sin adición y con adición, si era similar, y puede verse que la velocidad máxima de consumo de gasolina disminuyó con el incremento de MTBE, mientras que la velocidad máxima de consumo de este último aumentó. Deeb y col. (2001) con un cultivo puro PM1 capaz de utilizar MTBE como única fuente de carbono obtuvieron resultados diferentes. Se encontró que la presencia de MTBE en mezclas con cada uno de los compuestos BTEX, no parece inhibir la biodegradación de BTEX, de hecho su degradación fue estimulada en presencia de MTBE. Sin embargo el etil-benceno y los xilenos inhibieron severamente la biodegradación del MTBE mientras que el tolueno y benceno fueron utilizados preferencialmente sobre el MTBE. Los investigadores sugieren que el benceno fue degradado por una vía independiente de la vía de degradación del MTBE. En el presente trabajo no se observó inhibición en el consumo del MTBE, de hecho se observa que los coeficientes cometabólicos aumentan en los experimentos con adición, lo que indica que al incrementar el MTBE los consorcios incrementan la degradación del mismo a costa de la degradación de la gasolina. Posiblemente la ruta de degradación de MTBE con el cultivo PM1 es diferente a la ruta de degradación utilizada por los consorcios estudiados en este trabajo. Los resultados del presente trabajo concuerdan con los obtenidos por Garnier y col. (1999) quienes observaron un efecto inhibitorio entre pentano y MTBE en microcosmos conteniendo una cepa de *P. aeruginosa* capaz de consumir el hidrocarburo y de cometabolizar al oxigenante. También coinciden parcialmente con los reportados por Eweis y col. (1998-b), quienes encontraron que la presencia de algunos compuestos representativos de la gasolina como hexano, tolueno y benceno no inhibieron el consumo de MTBE por sus cultivos sin embargo el MTBE no inhibió el consumo de estos compuestos.

Tabla 5.2 Datos cinéticos de degradación de la gasolina Magna SIN con adición exógena de MTBE.

Microorganismo	V _{máx}		% degradación Gasolina	% degradación MTBE	CC mg MTBE/mg gasolina
	Gasolina mg/mg prot-h (R ² del ajuste)	MTBE mg/mg prot-h (R ² del ajuste)			
Consortio P	0.085±0.011 (0.996)	0.082±0.033 (0.986)	87.5	69.2	0.891
Consortio M	0.165±0.053 (0.988)	0.112±0.020 (0.994)	88.2	73.7	0.945
Consortio T1	0.044±0.009 (0.983)	0.047±0.010 (0.986)	84.6	73.1	1.090
Consortio T2	0.125±0.009 (0.998)	0.147±0.021 (0.996)	93.4	92.0	1.111

Intervalos de confianza del 95% para V_{máx}.

De estos experimentos observamos que los compuestos de la gasolina (al menos los volátiles) permitieron la degradación cometabólica del MTBE y que los cuatro consorcios estudiados mostraron esta capacidad. En consecuencia, para estudios posteriores se decidió mezclar los cuatro consorcios y mantenerlos en gasolina, formando un nuevo consorcio, el consorcio G.

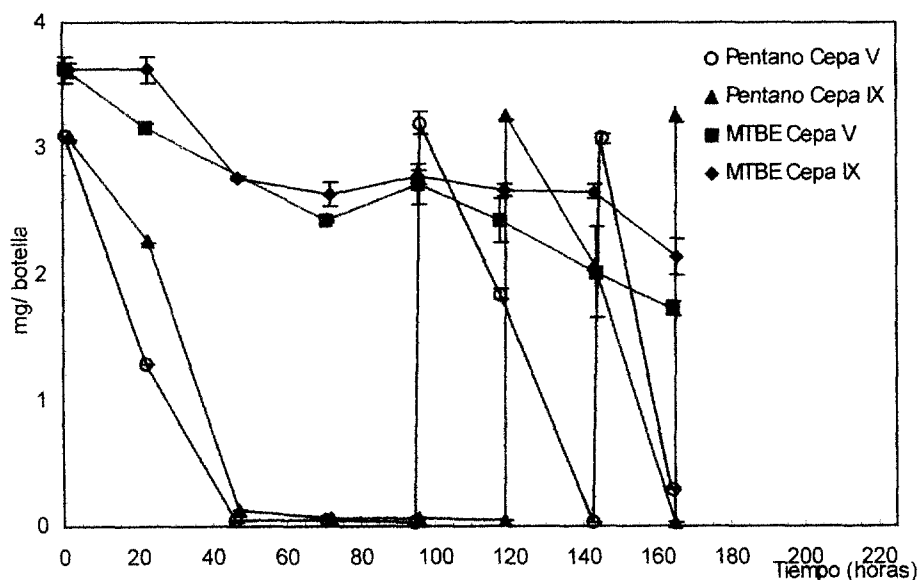
5.2 Degradación cometabólica de MTBE por cepas puras.

5.2.1 Aislamiento de cepas a partir del consorcio P.

En forma paralela a los experimentos con consorcios, del consorcio P alimentado con pentano se aislaron varias cepas puras con el objeto de obtener al menos una capaz de metabolizar o cometabolizar al MTBE. Inicialmente se aislaron 10 cepas puras en agar nutritivo. Posteriormente se evaluó su capacidad de crecer en pentano mediante su cultivo en un desecador con atmósfera de pentano. Las cepas se sembraron en MSM solidificado con agar bacteriológico. De aquí se aislaron 4 cepas puras (designadas como cepas IV, V, VIII y IX) que se emplearon para los experimentos de degradación de MTBE. Al principio se consideró que las cepas V y IX eran diferentes puesto que la morfología de las colonias: color y bordes, parecían distintas pero al cabo de varias resiembras, de los resultados mostrados mas adelante y de su posterior clasificación resultaron ser la misma cepa.

5.2.2 Cinéticas de degradación con cepas puras.

Las cinéticas de degradación cometabólica de MTBE en presencia de pentano por las cepas V y IX se muestran en la Gráfica 5.10.

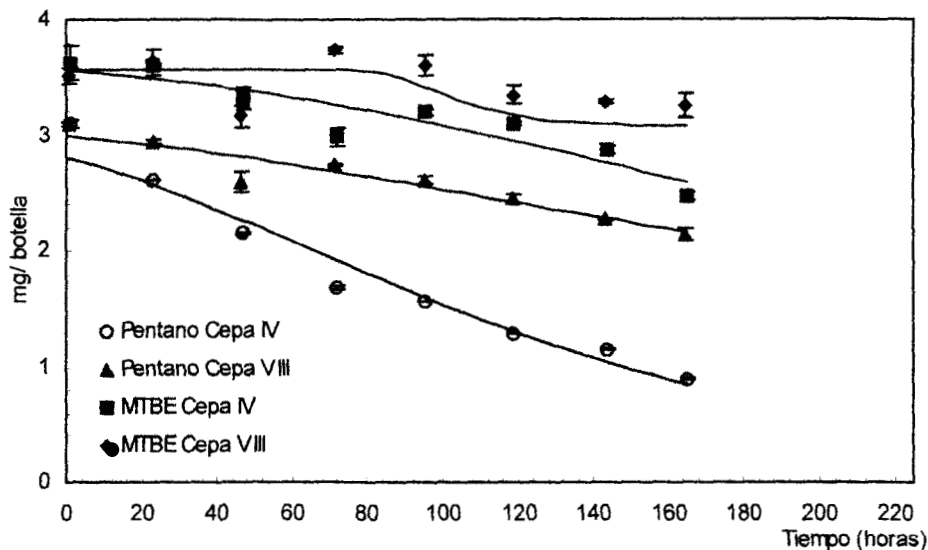


Gráfica 5.10 Cinética de degradación cometabólica de MTBE con pentano por las cepas V y IX con adiciones sucesivas de pentano.

Al evaluar la capacidad de cometabolismo de las cepas puras V y IX se observó que ambas cepas tuvieron un comportamiento similar y aproximadamente a las 45 horas de cultivo el pentano se agotó al mismo tiempo que la desaparición del MTBE prácticamente cesó (Gráfica 5.10). Alrededor de las 95 horas, se adicionó pentano por segunda ocasión al microcosmos de la cepa V y la degradación del MTBE se reanudó. Cuando se agotó el pentano por segunda ocasión se hizo una tercera adición, lo que permitió que la degradación del MTBE sea ininterrumpida desde las 95 horas hasta el final del experimento a las 165 horas. En cuanto a la cepa IX también se pudo observar que la degradación del MTBE cesó en cuanto se agotó el sustrato de crecimiento. En este caso la segunda adición de pentano se hizo a las 120 horas, lo que nos permitió ver que la degradación de MTBE no se reanudó inmediatamente después de esta adición sino que el cultivo requirió de un periodo de readaptación de alrededor de 20 horas antes de continuar con la degradación del MTBE. Nuevamente, todos estos datos indican que la desaparición del MTBE es por cometabolismo.

Siempre que fue posible, los datos experimentales fueron ajustados mediante el modelo de Gompertz, sin embargo en varios experimentos como en el caso de los experimentos mostrados en la Gráfica 5.10 fue necesario hacer adiciones sucesivas de sustrato debido a que la velocidad de consumo del MTBE era comparativamente menor que la de degradación del sustrato, es decir, éste último se consumió en muy poco tiempo y no se observaba una disminución apreciable del MTBE. Después de varias adiciones sucesivas de la fuente de carbono y

energía, si se logró en algunos casos observar una degradación cometabólica apreciable del MTBE. Esto impidió que los datos pudieran modelarse de acuerdo con la ecuación de Gompertz ya que solo pudieron obtenerse dos o tres puntos experimentales entre la adición y el agotamiento del sustrato, en consecuencia se usaron aproximaciones lineales para estimar la velocidad máxima de consumo en el intervalo de tiempo de experimentación (en el apéndice A se describe con mayor detalle la aproximación lineal en experimentos con adiciones sucesivas).



Gráfica 5.11 Degradación cometabólica de MTBE con pentano por las cepas puras IV y VIII.

En la gráfica 5.11 se presentan las cinéticas con las cepas IV y VIII. Ambas pudieron cometabolizar al MTBE pero más lentamente y en menor grado que las cepas V y IX, la cepa VIII tardó alrededor de 80 horas antes de comenzar la desaparición del oxigenante; por lo que respecta al consumo de pentano también fue menor, no logrando agotar el sustrato durante el tiempo de experimentación. En vista de lo anterior, para trabajos posteriores se eligieron las cepas V y IX, que como se indicó anteriormente se sospechó que se trataba de la misma cepa.

La Tabla 5.3 muestra un resumen de los datos cinéticos de los experimentos con cepas puras creciendo en microcosmos conteniendo una mezcla de 5 μL /botella de pentano y 5 μL /botella de MTBE por botella.

225556

Tabla 5.3 Datos cinéticos de degradación de una mezcla de pentano y MTBE por cepas puras.

Cepa	V _{máx}		% degradación MTBE	CC mg MTBE/mg pent.
	Pentano mg/mg prot-h (R ² del ajuste)	MTBE mg/mg prot-h (R ² del ajuste)		
IV	0.017±0.003 (0.957)	0.008±0.010 (0.843)	31.9	0.525
V	0.130±0.050 NA	0.020±0.010 NA	52.4	0.210
VIII	0.010±0.002 (0.895)	0.010±0.004 (0.855)	7.30	0.272
IX	0.090±0.010 NA	0.020±0.010 NA	46.3	0.238

NA: No aplica, en estos casos no se hizo ajuste, se siguió el procedimiento indicado en el apéndice A. Intervalos de confianza del 95% para V_{máx}.

En esta Tabla puede constatar que las velocidades máximas de degradación de pentano por las cepas V y IX son muy semejantes, de hecho el intervalo de confianza de la cepa IX está contenido en el intervalo de la cepa V. En cuanto al MTBE las velocidades de degradación del MTBE son prácticamente las mismas para ambas cepas. Los coeficientes cometabólicos también son muy parecidos. Lo anterior fortalece la hipótesis de que ambas cepas son una misma en adición a su apariencia macro y microscópica. Posteriormente se mandó a identificar una mezcla de las dos cepas a la compañía Analytical Services Inc. (Williston, Vt., USA) quién dictaminó que se trataba efectivamente de una cepa pura de *Pseudomonas aeruginosa* la cual fue depositada en la Colección Nacional de Cultivos Microbianos, (CINVESTAV, México, D.F.) bajo el número CDBB-B-1230 (Garnier 1999-b).

Por lo que respecta a las cepas IV y VIII, se obtuvieron velocidades de consumo de sustrato aproximadamente un orden de magnitud menores a las cepas V y IX. Además la degradación del MTBE también fue menor tanto en velocidad de degradación como en porcentaje degradado. Las cepas IV y VIII fueron por lo tanto descartadas debido a su bajo potencial para biodegradar MTBE.

Al igual que con los consorcios, se evaluó la capacidad de cada una de las cepas puras de utilizar al MTBE como sustrato de crecimiento obteniendo en todos los casos resultados negativos (datos no mostrados).

5.3 Estudios de degradación cometabólica de MTBE con diferentes sustratos.

5.3.1 Microorganismos.

Para los estudios subsecuentes se utilizó un consorcio: el consorcio G y tres cepas puras: *P. aeruginosa* CDBB-B-1230, *P. aeruginosa*: CDBB-B-999 (ATCC 25619) y una cepa de *Pseudomonas sp.* denominada Cepa "Ps".

5.3.2 Sustratos.

Para los experimentos de degradación cometabólica del MTBE se utilizaron como sustratos de crecimiento los compuestos TBA, isobutanol, secbutanol, alcohol isoamílico y dietil éter, con una estructura molecular análoga a la del oxigenante. Como sustrato de referencia se empleó pentano.

5.3.3 Enriquecimiento de los cultivos.

Previamente a los estudios cinéticos con las sustancias propuestas, se llevó a cabo el enriquecimiento de los cultivos con dichas sustancias para asegurar que sirvieran como sustratos de crecimiento (fuentes de carbono y energía) y poder realizar la potencial degradación cometabólica el MTBE. El enriquecimiento de los cuatro cultivos duró aproximadamente cuatro meses con cambios semanales tanto del MSM como del sustrato en cuestión.

De los sustratos propuestos, no se logró mediante el enriquecimiento de los cultivos, el crecimiento en los alcoholes secbutílico, terbutílico (TBA) e isoamílico ni tampoco en MTBE. Al aumentar el tiempo de cultivo, la DO_{540} inicial de cada cultivo se redujo de 0.2 a casi cero. Asimismo las muestras al microscopio evidenciaron la disminución del número de células en todos estos casos. En cuanto a los otros sustratos probados: dietil éter, pentano y alcohol isobutílico los resultados fueron positivos desde las primeras semanas del enriquecimiento mostrando un notable incremento en la densidad óptica (en un orden de magnitud). Cada uno de estos compuestos se estudió mediante ensayos cinéticos para evaluar su potencial de inducción cometabólica del MTBE.

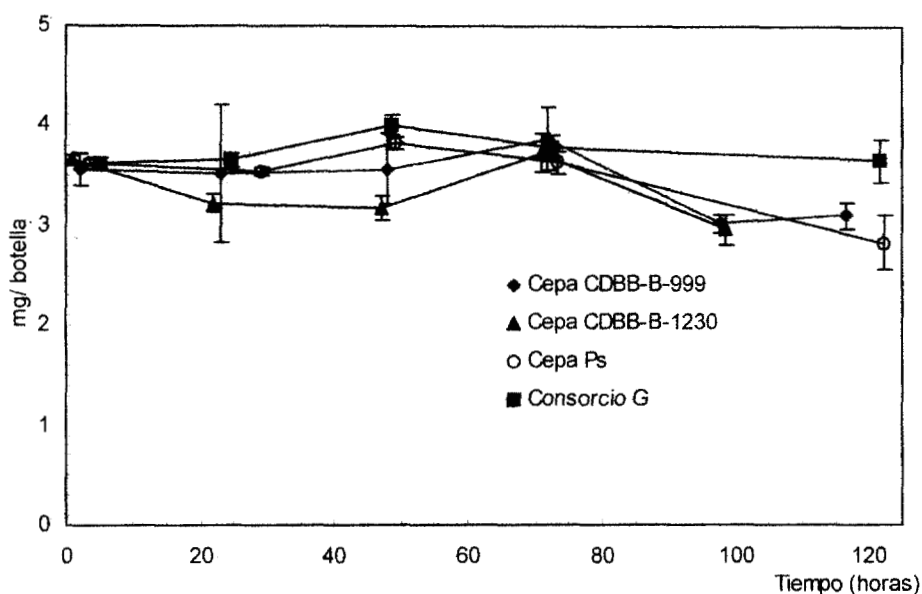
De los sustratos que no dieron resultados observables en el enriquecimiento, también se estudiaron cinéticas de degradación para su comprobación cuantitativa.

5.3.4 Cinéticas de degradación.

5.3.4.1 MTBE y los alcoholes secbutílico, terbutílico (TBA) e isoamílico.

Se llevaron a cabo cinéticas en microcosmos con los compuestos que dieron resultados negativos en los enriquecimientos de los cultivos: los alcoholes secbutílico, ter-butílico e isoamílico así como el MTBE con el fin de corroborar de un modo más contundente la ausencia de degradación con los microorganismos ensayados. En el caso de los alcoholes, debido a su relativamente baja volatilidad, fue necesario inyectar una mayor cantidad de la fase gaseosa (0.5 mL) de cada microcosmos para poder detectarlos, a diferencia del MTBE que bastó con (0.1 mL).

En ninguno de los microcosmos con los microorganismos mencionados arriba se observó la degradación del MTBE como única fuente de carbono y energía (Gráfica 5.12).



Gráfica 5.12 Degradación de MTBE como única fuente de carbono y energía durante 120 horas.

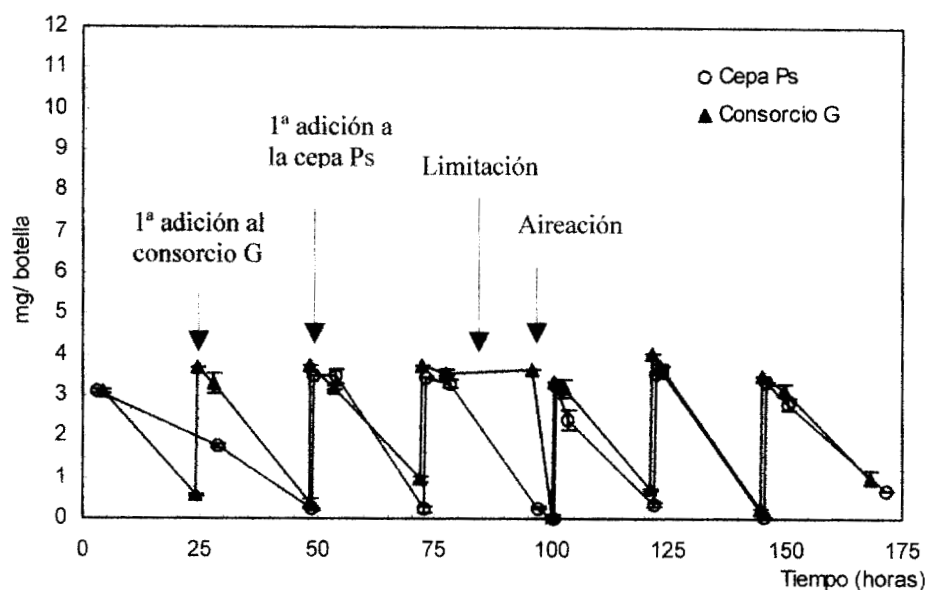
Tampoco se observó asimilación de los alcoholes como sustratos de crecimiento (datos no mostrados). Es particularmente interesante el caso del alcohol terbutílico (TBA), ya que se ha planteado que este compuesto es un intermediario en la ruta de degradación del MTBE (Church, 1997; EPA, 1994-b; Hanson, 1999; Hardison, 1997; Salanitro, 1994; Steffan, 1997), es decir, el paso limitante en la mineralización de este último por estos cultivos podría ser en principio la ruptura del enlace éter o la degradación del alcohol resultante. Kharoune y Lebeault (2000) encontraron en sus estudios de degradación por lotes

de mezclas de ETBE, MTBE y TAME que los dos últimos oxigenantes son más resistentes a la biodegradación y argumentan que esto puede deberse a un impedimento estérico al ataque enzimático. De hecho la accesibilidad del carbono metoxi de $\text{CH}_3\text{O-MTBE}$ o $\text{CH}_3\text{O-TAME}$ es quizás más difícil de romper que el carbono etoxi $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O-ETBE}$ debido probablemente a la proximidad del enlace éter. Además sus intermediarios metabólicos: TBA, TBF y TAA fueron degradados mucho más fácilmente que ETBE, MTBE y TAME. Esto sugiere que el paso limitante principal para la degradación de oxigenantes es probablemente la accesibilidad y el rompimiento del enlace éter y no la asimilación de intermediarios. En el presente caso ninguna de las dos reacciones pudo ser realizada por los microorganismos estudiados ya que no utilizaron como única fuente de carbono ni al MTBE ni al TBA. Por lo que respecta al MTBE, como parte de las cinéticas de degradación cometabólica del oxigenante con otros sustratos, se utilizó como control una botella de microcosmos conteniendo únicamente MTBE sin el sustrato de crecimiento.

5.3.4.2 Cinéticas con pentano.

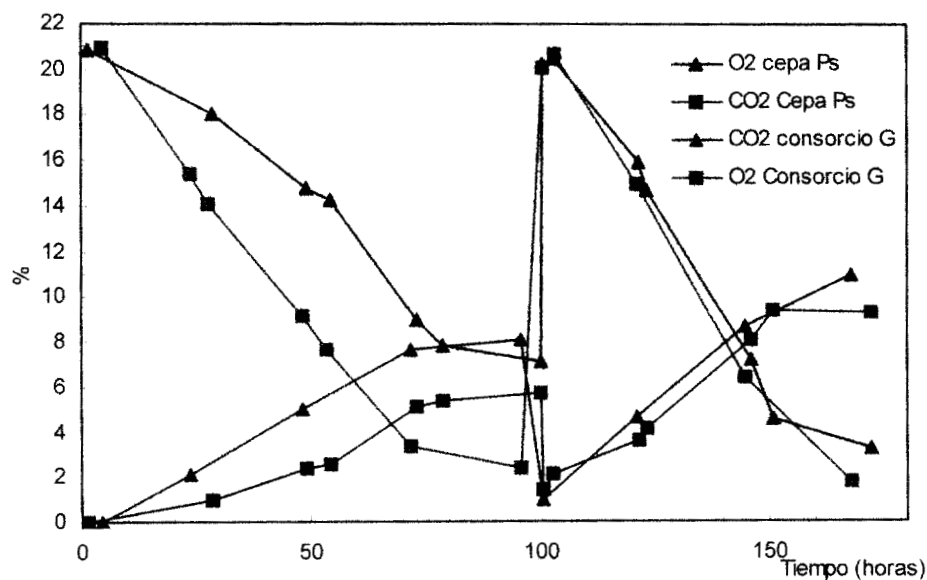
Las primeras cinéticas llevadas a cabo con pentano fueron con el consorcio G y con la cepa pura Ps. Los resultados de estos experimentos mostraron que ambos cultivos asimilaron rápidamente el hidrocarburo por lo que se hicieron adiciones sucesivas del sustrato en ambos microcosmos: 6 adiciones al consorcio G y 5 adiciones a la cepa Ps (Gráfica 5.13). La velocidad máxima de consumo de sustrato fue calculada en $0.152 \text{ mg/h}\cdot\text{mg proteína}$ para la cepa Ps y en $0.694 \text{ mg/h}\cdot\text{mg proteína}$ para el consorcio, lo que muestra la superioridad degradativa de éste consorcio sobre la cepa pura.

Debido a la cantidad de pentano degradado, alrededor de las 75 horas de cultivo, la cantidad de oxígeno disminuyó de tal forma que el consumo de pentano se inhibió en el caso del consorcio G (Gráfica 5.14), lo que indica que las bacterias responsables de la degradación cometabólica del MTBE en este consorcio eran aerobias y que en este caso no se observó degradación del MTBE bajo condiciones anóxicas, lo cual concuerda con lo observado por Salanitro y col. (2000) y Church y col. (1999); fue necesario en consecuencia abrir la botella de microcosmos en condiciones asépticas para airearlo (96 horas) y que la degradación del sustrato prosiguiera.



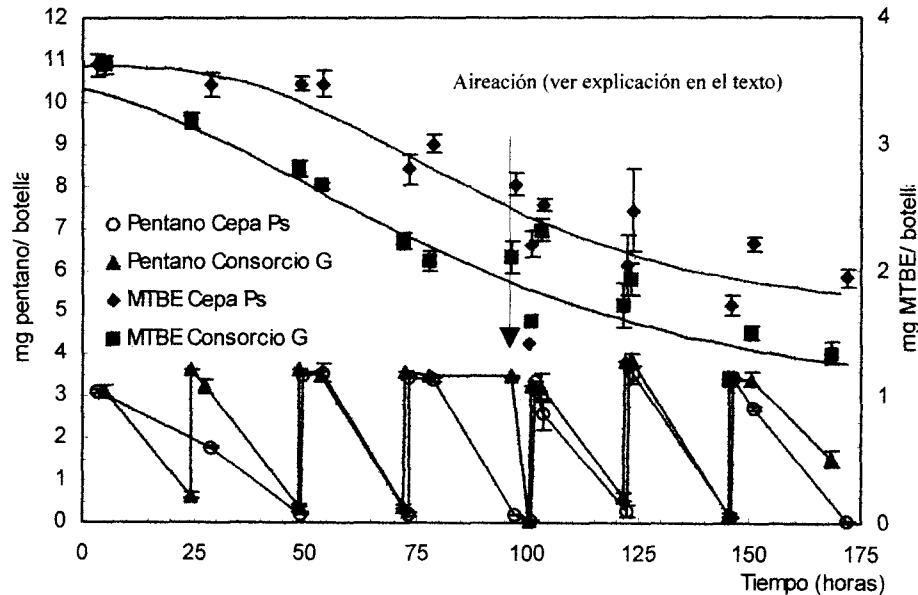
Gráfica 5.13 Consumo de pentano por la cepa Ps y el consorcio G. Se adicionó sustrato periódicamente y hubo necesidad de airear las botellas cuando el oxígeno casi se agotó.

En el caso de la cepa Ps no se observó la inhibición en el consumo del sustrato pero debido a que el oxígeno también era bajo y el bióxido de carbono alto en este microcosmos, también se decidió abrirlo y airearlo para evitar una limitación potencial (Gráfica 5.13). Como puede observarse, la velocidad de consumo de pentano después de la aireación fue muy similar para ambos cultivos.



Gráfica 5.14 Consumo de oxígeno y formación de bióxido de carbono en los microcosmos de la cepa Ps y el consorcio G alimentados solo con pentano.

Los datos de degradación de pentano en presencia de MTBE en los experimentos de cometabolismo son idénticos a los del experimento sin MTBE: obteniéndose una velocidad máxima de degradación de 0.161 mg/h·mg proteína para la cepa Ps y 0.720 mg/h·mg proteína para el consorcio. Este resultado muestra que la presencia del oxigenante no inhibe la degradación del hidrocarburo (Gráfica 5.15).



Gráfica 5.15 Microcosmos alimentados con pentano y MTBE.

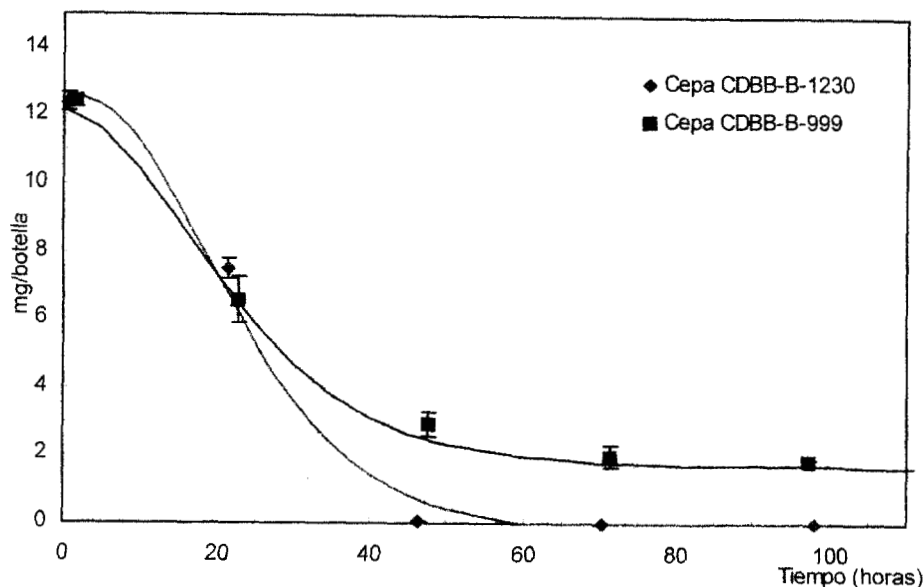
Al igual que en el experimento anterior, llegó un momento que el oxígeno de los microcosmos disminuyó notablemente (datos no mostrados), lo que ocasionó que se inhibiera durante algunas horas el consumo de pentano por el consorcio G. En las 97 horas de la cinética las botellas de ambos cultivos se airearon lo que permitió la reanudación en la desaparición del sustrato. No se observó inhibición en el consumo del MTBE. Cuando se airearon las botellas, naturalmente se volatilizó parte del MTBE, el cual se cuantificó y pudo reponerse.

Los siguientes experimentos fueron con las cepas CDBB-B-999 y CDBB-B-1230.

Para evitar el problema de adicionar periódicamente más sustrato a los microcosmos, en esta ocasión se decidió comenzar con una mayor cantidad inicial de pentano: 20 μ L en vez de 5 (Gráfica 5.16).

Ambas cepas mostraron una capacidad degradativa más o menos parecida, siendo no obstante superior la cepa 1230 que logró una $V_{m\acute{a}x}$ de 0.391 mg/h·mg proteína contra 0.294 mg/h·mg proteína de la cepa 999. Además la cepa 1230 logró agotar el sustrato alrededor de las 60 horas de cultivo mientras que con la

cepa 999 se detuvo la degradación lográndose un máximo de 85% de consumo a las 60 horas.



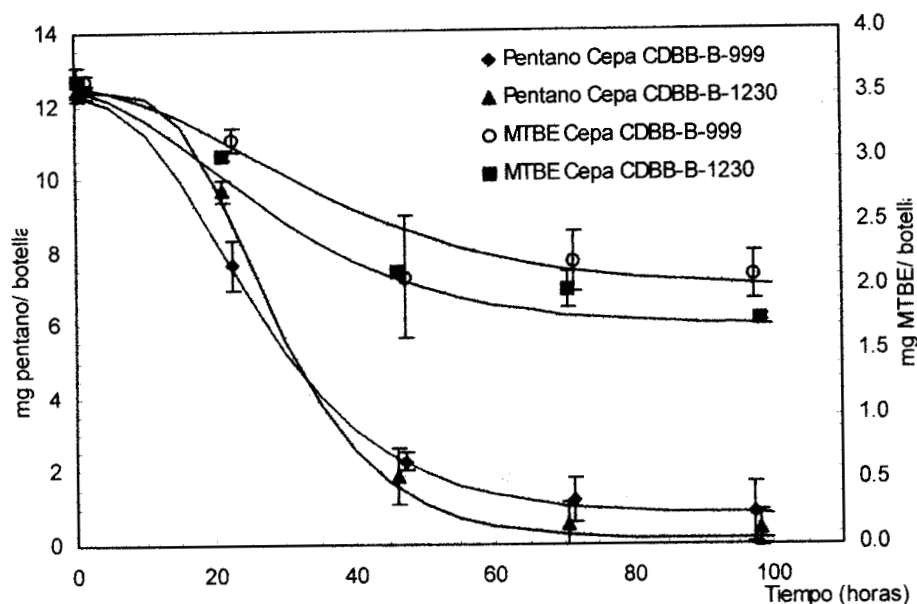
Gráfica 5.16 Cinéticas de consumo de pentano por las cepas *P. aeruginosa* CDBB-B-999 y CDBB-B-1230.

Los experimentos de degradación cometabólica de MTBE en presencia de pentano se muestran en la Gráfica 5.17.

Al examinar el consumo de pentano en presencia y en ausencia de MTBE, puede verse nuevamente que la presencia del oxigenante no inhibe la degradación del sustrato. La cepa 1230 logró una velocidad máxima de 0.396 mg/h·mg proteína y la cepa 999 0.297 mg/h·mg proteína para el consumo de pentano en presencia de MTBE.

En cuanto a la degradación del MTBE se calcularon velocidades máximas de 0.038 y 0.023 mg/h·mg proteína para la cepa 1230 y 999 respectivamente. Es interesante observar que el coeficiente cometabólico calculado para ambas cepas fue el mismo: 0.158 mg de MTBE/mg de pentano, esto es, ambas cepas degradan cometabólicamente al oxigenante en la misma proporción con respecto al sustrato.

Una vez que el sustrato de crecimiento se agota o deja de consumirse como en el caso de la cepa 999 que degrada un máximo de 93% y cesa la degradación a las 80 horas de cultivo, la biodegradación del MTBE cesa también, nuevamente una clara indicación de cometabolismo.

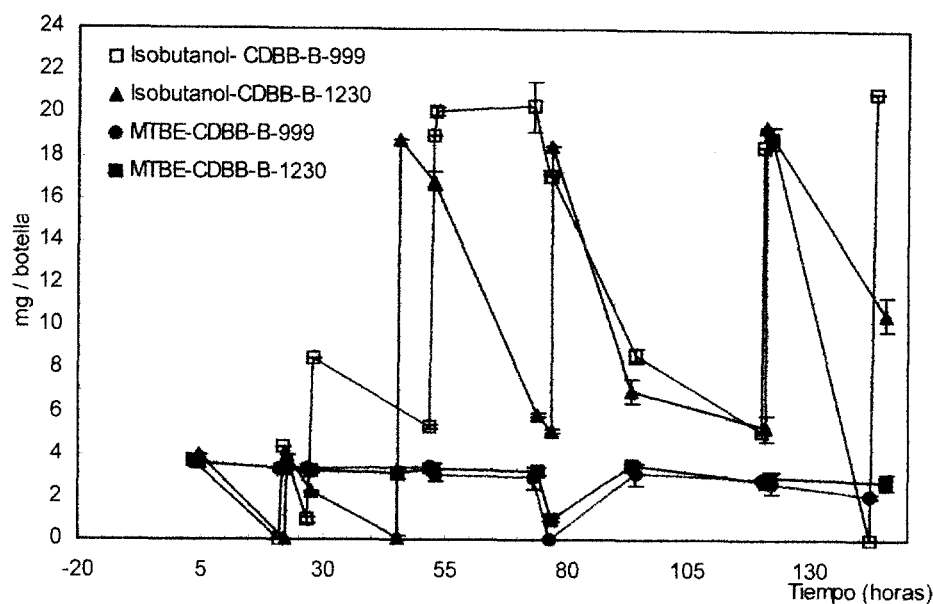


Gráfica 5.17 Cinéticas de degradación cometabólica de MTBE y consumo de pentano por las cepas puras de *P. aeruginosa* CDBB-B-999 y CDBB-B-1230.

5.3.4.3 Cinéticas con isobutanol.

No todos los cultivos microbianos estudiados pudieron asimilar el isobutanol. Desde la fase de enriquecimiento se observó la incapacidad de crecer en este compuesto de la cepa Ps y del consorcio G. Lo anterior es extraño con respecto al consorcio ya que en principio debería incluir a la cepa CDBB-B-1230 que sí pudo crecer en este sustrato. Posiblemente la cepa 1230 desapareció del consorcio durante las resiembras en el periodo de enriquecimiento o su interacción con las demás bacterias inhibieron su capacidad de asimilar al alcohol.

Las cinéticas de degradación cometabólica de MTBE con isobutanol se muestran en la Gráfica 5.18. Solamente las cepas CDBB-B-999 y CDBB-B-1230 pudieron utilizar al alcohol como sustrato de crecimiento. La desaparición del sustrato en estos casos fue muy rápida ($V_{m\acute{a}x}$ de 0.630 y 0.844 mg/h·mg proteína para las cepas 1230 y 999 respectivamente) por lo que se realizaron como en algunos de los experimentos con pentano, adiciones sucesivas, además de que se incrementó la cantidad adicionada de 5 μ L en las primeras dos adiciones hasta 25 μ L en las adiciones subsecuentes. También en este caso la concentración de oxígeno en la fase gaseosa “headspace” disminuyó de modo que fue necesario airear las botellas de microcosmos a las 74 horas de cultivo.



Gráfica 5.18 Degradación cometabólica de MTBE en presencia de isobutanol.

En las rutas metabólicas que han sido propuestas para la degradación de MTBE, observamos que uno de los primeros pasos es la formación de ter-butil alcohol (TBA), lo que implica la ruptura del enlace éter. Por lo tanto, para poder mineralizar la molécula de MTBE es menester poder degradar también la molécula de TBA.

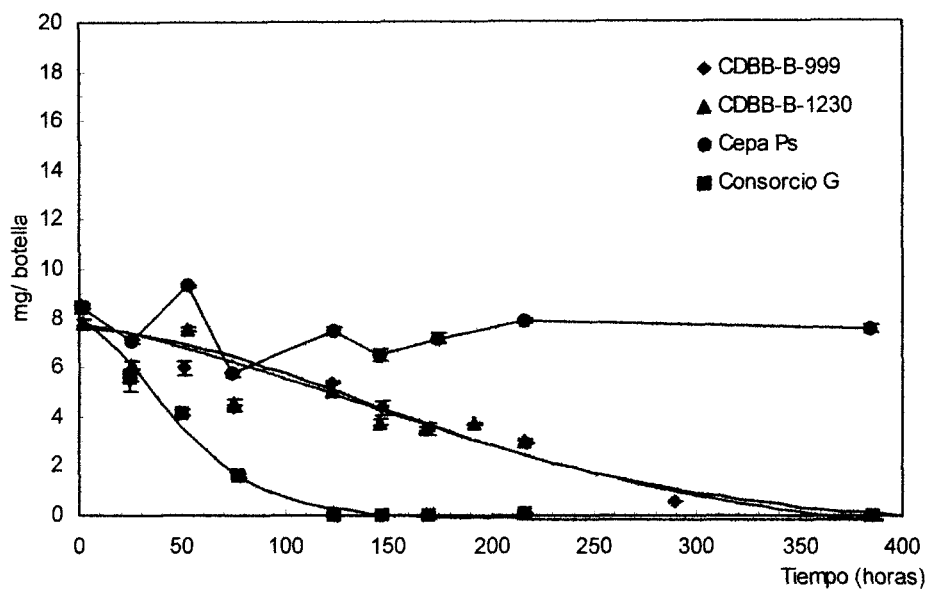
Los experimentos con isobutanol, que es una sustancia con parecido estructural al TBA muestran la gran capacidad de mineralización de este compuesto con dos de los microorganismos estudiados; asimismo se aprecia una pobre capacidad de cometabolizar al MTBE ($V_{m\acute{a}x}$ de 0.008 mg/h-mg proteína y coeficientes cometabólicos de 0.027 y 0.024 mg MTBE/ mg de isobutanol para la cepa 1230 y 999 respectivamente). Como ya se mencionó anteriormente, las mismas cepas fueron incapaces de degradar TBA. La composición estructural influye al velocidad de biotransformación de xenobióticos como las cadenas ramificadas. (Acuna-Askar, y col. 1999).. La molécula de TBA posee un carbono terciario unido directamente a un grupo hidroxilo; el isobutanol también tiene un carbono terciario pero el grupo hidroxilo esta unido a la molécula a un carbono primario por lo que los problemas de ruptura enzimática debidas a impedimento estérico entre el oxígeno y los grupos metilo unidos al carbono terciario deben ser menores en el isobutanol lo que lo hacen más asimilable. Los carbonos terciarios, tales como los de grupo terbutilo en el MTBE y ETBE, son invariablemente muy resistentes a la biodegradación (Prince, 2000) que los carbonos primarios y secundarios. No obstante, lo anterior no explica porqué

ningún cultivo pudo metabolizar al alcohol isoamílico que es un homólogo del isobutanol con un átomo más de carbono.

En los experimentos con isobutanol en forma similar a lo observado en las cinéticas con pentano tampoco se observó que la presencia del MTBE inhibiera el consumo del sustrato de crecimiento (datos no mostrados).

5.3.4.4 Cinéticas con dietil éter.

Los experimentos con dietil éter mostraron que este compuesto sirve como fuente de carbono y energía para los cultivos estudiados, salvo la cepa Ps (Gráfica 5.19).

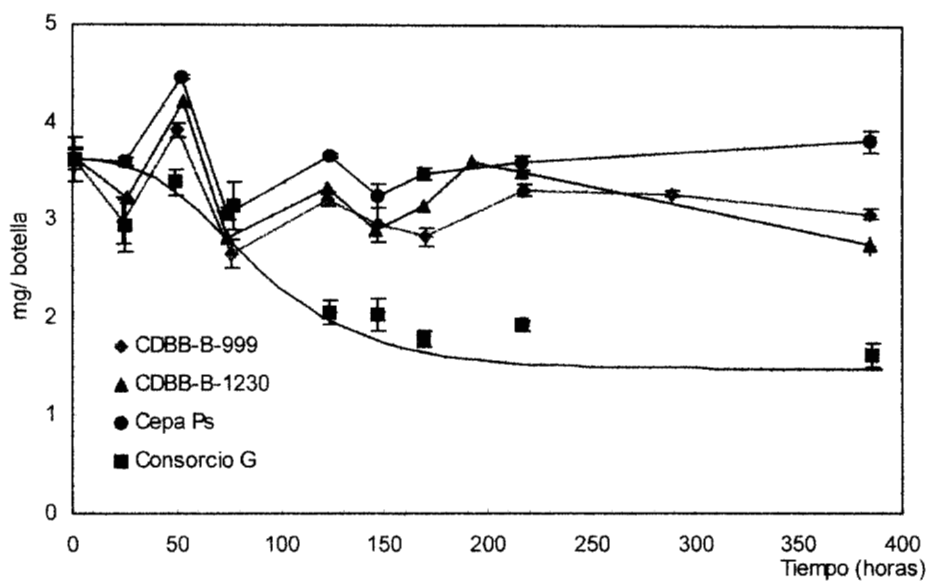


Gráfica 5.19 Experimento de degradación de DEE; tres de los cuatro cultivos estudiados pudieron crecer en éter.

Las velocidades máximas de degradación de DEE calculadas fueron: 0.027 mg/h·mg proteína para la cepa 1230; 0.025 y 0.093 mg/h·mg proteína para la cepa 999 y el consorcio G respectivamente

Sólo uno de los microcosmos, el del consorcio G, mostró la capacidad de degradar cometabólicamente la molécula de MTBE obteniéndose una velocidad máxima de degradación de 0.019 mg/h·mg proteína y un coeficiente cometabólico de 0.220 mg MTBE/mg DEE. Tres de los cultivos pudieron romper el enlace éter del dietil éter puesto que pudieron utilizarlo como fuente de carbono y energía (Gráfica 5.19), quizás por una vía semejante a la propuesta por Hardison y col. (1997), pero fueron incapaces de romper el mismo enlace en el

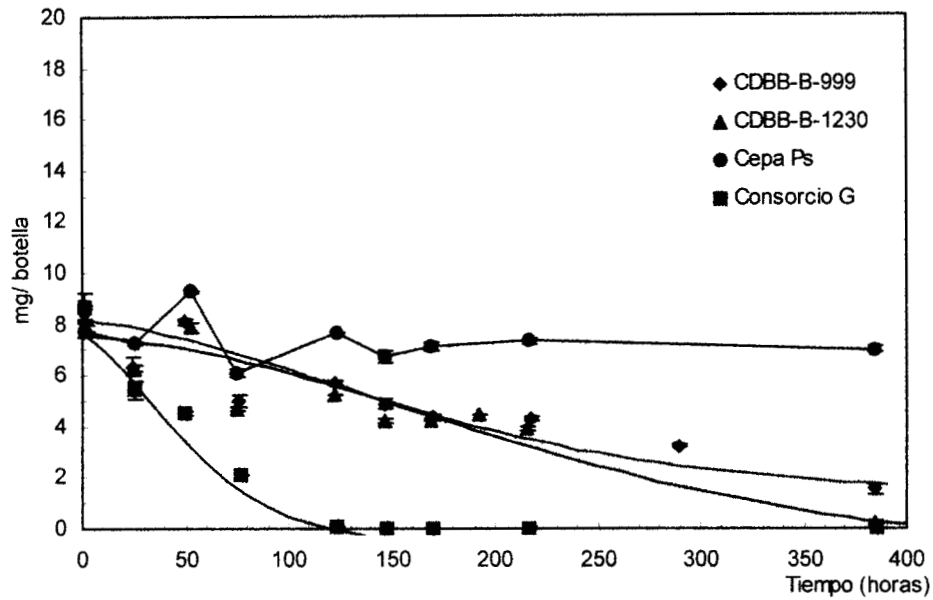
MTBE ya que no pudieron cometabolizarlo (Gráfica 5.20). Nuevamente el impedimento estérico del carbono terciario unido a un átomo de oxígeno en este compuesto parece jugar un papel determinante en su degradación (Kharoune y Lebeault, 2000). Además, por sí mismos, los enlaces éter tienden a ser muy resistentes a su biodegradación (Prince, 2000).



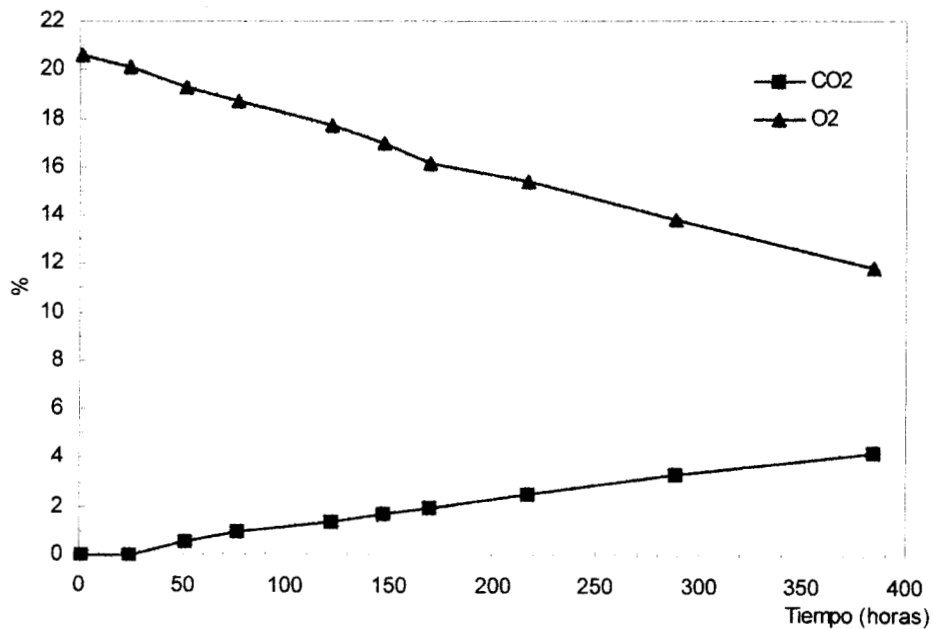
Gráfica 5.20 Cometabolismo de MTBE en presencia de DEE.

La presencia del MTBE no tuvo una influencia apreciable en la degradación del dietil éter como se puede ver al comparar las Gráficas 5.19 y 5.21. En la Tabla 5.4 se observa que en base a los intervalos de confianza para las velocidades máximas de degradación de DEE por el consorcio G en ausencia y en presencia de MTBE, las velocidades máximas son prácticamente las mismas: 0.093 ± 0.017 y 0.086 ± 0.013 mg/h-mg proteína.

La cepa CDBB-B-999 no logró agotar el sustrato en el tiempo que duró la cinética, mientras que el microcosmos que no contenía MTBE sí logró consumirlo totalmente alrededor de las 360 horas de cultivo. La ligera inhibición en el consumo del sustrato pudo deberse a problemas de oxigenación; el oxígeno disminuyó de un 21% a 12.8% a las 360 horas de cultivo en la fase gaseosa del microcosmos con MTBE, (Gráfica 5.22).



Gráfica 5.21 Asimilación de DEE en presencia de MTBE. Las curvas de degradación del MTBE se muestran en la Gráfica 5.20.



Gráfica 5.22 Consumo de oxígeno y formación de bióxido de carbono durante la degradación de DEE por la cepa CDBB-B-999.

5.3.4.5 Resumen de los datos cinéticos.

En la Tabla 5.4 vemos las velocidades de degradación de los sustratos metabolizados por los cultivos ensayados; como ya se indicó, no todos los compuestos sirvieron como sustratos de crecimiento. Las mayores velocidades se observan con pentano (consorcio G) y con isobutanol (cepas 999 y 1230) y las menores con dietil éter.

Tabla 5.4 Velocidad máxima de consumo de sustrato (mg/h·mg proteína)

Cepa/sustrato	En ausencia de MTBE			En presencia de MTBE		
	Pentano	Dietil Éter	Isobutanol	Pentano	Dietil Éter	Isobutanol
CDBB-B-1230	0.391±0.112 (0.998)	0.027±0.010 (0.965)	0.623±0.033 NA	0.396±0.149 (0.991)	0.023±0.009 (0.943)	0.630±0.100 NA
CDBB-B-999	0.294±0.060 (0.992)	0.025±0.010 (0.963)	0.972±0.051 NA	0.297±0.106 (0.984)	0.024±0.006 (0.961)	0.844±0.153 NA
Cepa Ps	0.152±0.041 NA	NC	NC	0.161±0.050 NA	NC	NC
Consorcio G	0.694±0.071 NA	0.093±0.017 (0.988)	NC	0.720±0.080 NA	0.086±0.013 (0.979)	NC

NC: No consumido

NA: No aplica, en estos casos no se hizo ajuste, se siguió el procedimiento indicado en el apéndice A
Intervalos de confianza del 95% para $V_{m\acute{a}x}$.

Puede apreciarse de acuerdo a los intervalos de confianza, que los resultados de consumo de los sustratos en presencia de MTBE son muy similares a los de consumo de sustratos sin MTBE, es decir, no vemos que el oxigenante inhiba el consumo de los sustratos. Las pequeñas diferencias pueden deberse en parte a error experimental.

En la Tabla 5.5 se reportan los datos cinéticos de degradación de MTBE en presencia de los sustratos que mostraron actividad cometabólica positiva. En este caso, la mayor velocidad máxima de degradación del MTBE se obtiene con pentano (cepa 1230). Con respecto al isobutanol, a pesar de ser un buen sustrato de crecimiento (de hecho el mejor para la cepa 999), este sustrato permitió una muy pobre degradación cometabólica del MTBE (0.008 mg/h·mg proteína). En la misma tabla se resumen los coeficientes cometabólicos, pudiendo observar que en este caso el valor más alto fue obtenido por el consorcio G (0.232 mg MTBE/mg pentano) cuando cometabolizó el oxigenante durante el consumo de pentano. Un valor muy semejante se obtuvo con el mismo consorcio al degradar MTBE en presencia de DEE (0.220 mg MTBE/mg DEE). Este último dato podría indicar que quizás las enzimas responsables de la ruptura del dietil éter y que permiten el cometabolismo del MTBE son más afines al oxigenante que las enzimas que degradan al isobutanol y que también rompen (aunque muy pobremente) cometabólicamente la molécula de MTBE.

225556

Tabla 5.5 Velocidad máxima de degradación cometabólica de MTBE en presencia de los sustratos indicados y coeficientes cometabólicos

Cepa/sustrato	V _{máx} (mg/h-mg proteína)			CC (mg MTBE/-mg Sustrato)		
	Pentano	DEE	Isobutanol	Pentano	DEE	Isobutanol
CDBB-B-1230	0.038±0.009 (0.981)	NC	0.009±0.005 NA	0.158	NC	0.027
CDBB-B-999	0.023±0.007 (0.944)	NC	0.008±0.006 (NA)	0.159	NC	0.024
Cepa Ps	0.017±0.006 (0.877)	NC	NC	0.110	NC	NC
Consortio G	0.017±0.004 (0.941)	0.019±0.005 (0.947)	NC	0.232	0.220	NC

NC: No Cometabolizado

NA: No aplica, en estos casos no se hizo ajuste, se siguió el procedimiento indicado en el apéndice A
Intervalos de confianza del 95% para V_{máx}.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES.

6.1 Degradación cometabólica de MTBE con gasolina por consorcios.

- 1) Se obtuvieron cuatro consorcios bacterianos capaces de degradar los compuestos volátiles (30°C) de la gasolina Magna SIN. La mayor velocidad máxima de degradación se obtuvo con el consorcio M con 0.182 mg de gasolina degradada por hora por miligramo de proteína. La menor velocidad fue para el consorcio T1 (0.074 mg/h·mg proteína).
- 2) Ninguno de los consorcios fue capaz de asimilar al MTBE como única fuente de carbono y energía.
- 3) Los cuatro consorcios mostraron la capacidad de cometabolizar al MTBE presente en la gasolina comercial Magna SIN.
- 4) La adición de MTBE exógeno inhibió la degradación de los compuestos volátiles de la gasolina por los consorcios ensayados, aún cuando la cantidad del oxigenante presente normalmente en la gasolina casi se triplicó.
- 5) La mayor velocidad máxima de degradación de gasolina adicionada con MTBE exógeno se obtuvo con el consorcio T2: 0.2 mg de gasolina/mg prot·h. Los resultados sugieren que los consorcios estudiados pueden aplicarse para la biorremediación de sitios contaminados con gasolina, y pueden favorecer la degradación cometabólica del MTBE.

6.2 Degradación cometabólica de MTBE por cepas puras.

- 6) Se aislaron tres cepas capaces de cometabolizar al MTBE en presencia de pentano. La cepa que mostró la mayor velocidad máxima de consumo de MTBE (0.02 mg/mg prot·h) fue *Pseudomonas aeruginosa* CDBB-B-1230.
- 7) Ninguna de las cepas aisladas mostró capacidad para degradar al MTBE como única fuente de carbono y energía.

6.3 Estudios de degradación cometabólica de MTBE con diferentes sustratos.

- 8) Ninguno de los microorganismos estudiados creció a partir de alcohol terbutílico, alcohol secbutílico o alcohol isoamílico como sustratos de crecimiento.
- 9) El pentano, el isobutanol y el dietil éter permitieron la degradación cometabólica del MTBE. El compuesto que mostró una mayor velocidad máxima de consumo de sustrato (0.8 mg/mg prot-h en presencia de MTBE) fue el isobutanol por la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* CDBB-B-999, sin embargo sólo dos de los cuatro cultivos estudiados pudieron asimilar este compuesto.
- 10) El pentano fue la única sustancia estudiada que pudo ser utilizada como sustrato de crecimiento por todos los cultivos estudiados.
- 11) El consorcio G mostró la mayor velocidad máxima de crecimiento con respecto a los cultivos puros tanto en pentano como en dietil éter.

Si bien a nivel de laboratorio es más sencillo mantener cepas puras, para estudios de biofiltración a nivel de planta piloto el uso de consorcios como el que se obtuvo en el presente trabajo puede ser una alternativa mejor que las cepas puras. Por lo tanto, aunque no se logró la degradación del MTBE como única fuente de carbono y energía, los resultados positivos de degradación cometabólica con consorcios microbianos puede ser una opción interesante para la biorremediación de sitios contaminados con MTBE, principalmente cuando se encuentra junto con otros compuestos como en la gasolina, Prince (2000).

RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES.

Es conveniente realizar los enriquecimientos de los cultivos en presencia de MTBE por un tiempo más prolongado del considerado en este trabajo ya que existen reportes como el de Fortin y col. (1999-a) en donde señalan la obtención de cultivos que degradan MTBE después de un periodo de enriquecimiento de varios meses.

En cuanto a los experimentos de cometabolismo en microcosmos, sobre todo aquellos en los que el sustrato se consume a una velocidad mucho mayor que el MTBE, se sugiere ya sea emplear frascos más grandes a los utilizados (125 mL) o bien disminuir la cantidad de líquido de cultivo (20 mL) para evitar problemas de limitación de oxígeno. Otra alternativa sería usar aire enriquecido en oxígeno.

Por otra parte el estudio de los intermediarios de la degradación del MTBE permitiría saber si los cultivos de *Pseudomonas* empleados en este trabajo existe una sola ruta de biodegradación cometabólica del oxigenante o si existen varias dependiendo del sustrato empleado, y si esta ruta coincide con las reportadas en otros trabajos para otros microorganismos. Por lo tanto es necesario establecer con mayor precisión las condiciones de medición de los posibles subproductos y evaluar técnicas analíticas alternas a la cromatografía de gases ya que algunas de estas sustancias son muy poco volátiles como es el caso del TBA. También sería interesante el estudio con reactivos marcados con carbono 14 lo que facilitaría los balances de masa.

La identificación de las enzimas responsables de la degradación cometabólica del MTBE es también interesante para poder determinar sus condiciones óptimas de actividad así como para evitar las condiciones que inhiban dicha actividad.

APÉNDICE A

ANÁLISIS DE REGRESIÓN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES

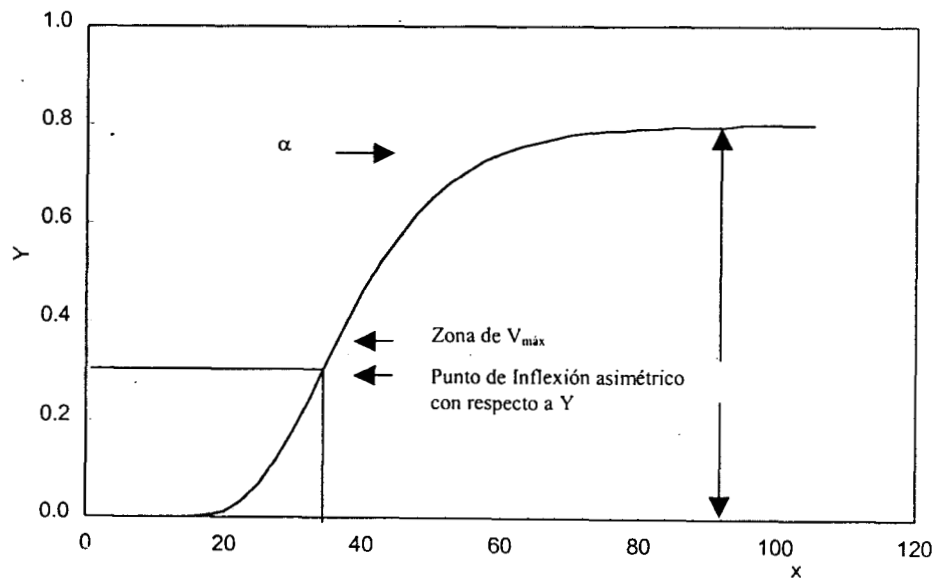
A.1 El Modelo de Gompertz

Como se mencionó en el capítulo de Materiales y Métodos los datos experimentales se modelaron mediante regresión usando el modelo de Gompertz, una función asintótica propuesta por Benjamin Gompertz en 1825 la cual ha sido utilizada para modelar el crecimiento tanto de plantas (Hunt, 1982), como de bacterias (Zwietering et. al. 1990). Esta función tiene tres parámetros arreglados como una doble exponencial:

$$Y = \alpha \exp(-\beta \exp^{-\kappa x}) \quad (\text{A.1})$$

Donde Y es la variable aleatoria a estimar; α (las unidades serán las mismas que Y) es la máxima cantidad de Y y κ (en unidades de x^{-1}) es la razón de cambio específico de la variable dependiente con respecto a la variable independiente. x es la variable independiente.

La forma de esta función se muestra en la gráfica A-1 usando un ejemplo hipotético en el que $\alpha = 0.8$, $\beta = 30$ y $\kappa = 0.1$.



Gráfica A-1 Modelo de Gompertz. Ejemplo hipotético en el que $\alpha = 1$, $\beta = 30$ y $\kappa = 0.1$

Puede verse en ésta gráfica que la función permite modelar fenómenos con una forma sigmoïdal como es el caso de muchos fenómenos biológicos.

El punto de inflexión en el modelo de Gompertz ocurre en $x = (\ln \beta)/\kappa$ al igual que el modelo logístico: $Y = \alpha/(1 + \beta \exp^{-\kappa x})$, sin embargo a diferencia de éste último que es simétrico con respecto al punto de inflexión en la variable Y en $\alpha/2$, el modelo de Gompertz es asimétrico en la dimensión Y con un punto de inflexión en α/e (Gráfica A-1). Esta característica le da mayor flexibilidad al modelo de Gompertz sobre el logístico (Hunt, 1982).

En el caso de los experimentos reseñados en este trabajo, el modelo de Gompertz quedará de la siguiente forma general:

$$S_c = \alpha \exp(-\beta \exp^{-\kappa t}) \quad (\text{A.2})$$

Donde $S_c = (S_0 - S)$, es la cantidad de sustrato **consumido** (en mg) en el tiempo t (en horas); α (mg de sustrato/ unidad experimental) es la máxima cantidad de sustrato consumida y κ (h^{-1}) es la velocidad específica de consumo del sustrato.

A.2 Cálculo de la velocidad máxima de consumo de sustrato de la ecuación de Gompertz

Para calcular la velocidad máxima de consumo de sustrato $V_{\text{máx}}$ a partir de la ecuación de Gompertz se deriva S_c con respecto a t :

$$\frac{d S_c}{dt} = \alpha \cdot \frac{d}{dt} [\exp(-\beta \exp(-\kappa t))] \quad (\text{A.3})$$

$$\frac{d}{dt} [\exp(-\beta \exp(-\kappa t))] = \exp(-\beta \exp(-\kappa t)) \cdot \frac{d}{dt} [-\beta \exp(-\kappa t)] \quad (\text{A.4})$$

$$\frac{d}{dt} [-\beta \exp(-\kappa t)] = -\beta \cdot \frac{d}{dt} [\exp(-\kappa t)] \quad (\text{A.5})$$

$$\frac{d}{dt} [\exp(-\kappa t)] = \exp(-\kappa t) \cdot \frac{d}{dt} (-\kappa t) \quad (A.6)$$

$$\frac{d}{dt} [\exp(-\kappa t)] = -\kappa \cdot \exp(-\kappa t) \quad (A.7)$$

Substituyendo (A.7) en (A.5):

$$\frac{d}{dt} [-\beta \exp(-\kappa t)] = \beta \cdot \kappa \exp(-\kappa t) \quad (A.8)$$

Substituyendo (A.8) en (A.4):

$$\frac{d}{dt} [\exp(-\beta \exp(-\kappa t))] = \beta \cdot \kappa \exp(-\beta \exp(-\kappa t)) \cdot \exp(-\kappa t) \quad (A.9)$$

Substituyendo (A.9) en (A.3):

$$V_c = \frac{d S_c}{dt} = \alpha \cdot \beta \cdot \kappa \exp(-\beta \exp(-\kappa t)) \cdot \exp(-\kappa t) \quad (A.10)$$

La ecuación (A.10) representa la velocidad de consumo V_c como función del tiempo.

Para obtener la velocidad máxima, se deriva la ecuación (A.10) y se iguala a 0, ya que cuando $f'(c) = 0$, la gráfica tiene una recta tangente horizontal en el punto donde $t = c$; y la ecuación (A.10) tiene un valor máximo o mínimo en dicho punto. Para saber si el punto es máximo o mínimo se aplica la prueba de la segunda derivada: si $f''(c) < 0$ entonces f tiene un máximo en c (Leithold, 1982).

Derivando la ecuación (A.10):

$$\frac{d V_c}{dt} = \frac{d}{dt} [\alpha \cdot \beta \cdot \kappa \exp(-\beta \exp(-\kappa t)) \cdot \exp(-\kappa t)] \quad (\text{A.11})$$

$$\begin{aligned} \frac{d V_c}{dt} = \alpha \cdot \beta \cdot \kappa \exp(-\kappa t) \cdot \frac{d}{dt} [\exp(-\beta \exp(-\kappa t))] + \\ \exp(-\beta \exp(-\kappa t)) \cdot \frac{d}{dt} [\alpha \cdot \beta \cdot \kappa \exp(-\kappa t)] \end{aligned} \quad (\text{A.12})$$

$$\frac{d}{dt} [\alpha \cdot \beta \cdot \kappa \exp(-\kappa t)] = \alpha \cdot \beta \cdot \kappa \cdot \frac{d}{d} [\exp(-\kappa t)] \quad (\text{A.13})$$

Substituyendo la ecuación (A.7) en (A.13):

$$\frac{d}{dt} [\alpha \cdot \beta \cdot \kappa \exp(-\kappa t)] = -\alpha \cdot \beta \cdot \kappa^2 \exp(-\kappa t) \quad (\text{A.14})$$

Substituyendo las ecuaciones (A.9) y (A.14) en (A.12) y reordenando los términos:

$$\frac{d V_c}{dt} = \exp(-\beta \exp(-\kappa t)) [\alpha \cdot \beta \cdot \kappa \exp(-\kappa t) (\beta \cdot \kappa \exp(-\kappa t) - \kappa)] \quad (\text{A.15})$$

Igualando a cero la función (A.16): $f'(c) = 0$ y despejando c :

$$c = \frac{\ln(1/\beta)}{-\kappa} \quad (\text{A.16})$$

En consecuencia se obtiene un mínimo o un máximo cuando la ecuación (A.11) sea evaluada en el punto c :

$$\frac{V_c(c)}{dt} = \alpha \cdot \kappa \exp(-1) \quad (\text{A.17})$$

Se puede demostrar que el valor de V_c/dt valuado en el punto c es un máximo ya que $f''(c) < 0$ (datos no mostrados), por lo que la ecuación (A.18) expresa el valor de la velocidad máxima de consumo $V_{m\acute{a}x}$:

$$V_{m\acute{a}x} = 0.368\alpha\kappa \quad (A.18)$$

La máxima velocidad de consumo de sustrato en cada unidad experimental, $V_{m\acute{a}x}$, se expresa en este trabajo en mg de sustrato/unidad experimental·h. Si se conoce el contenido de proteína en cada unidad experimental, se puede expresar la velocidad máxima en términos de mg de sustrato/mg prot·h.

Una de las ventajas que podemos mencionar del uso del modelo de Gompertz es que nos permite calcular de forma insesgada la velocidad máxima.

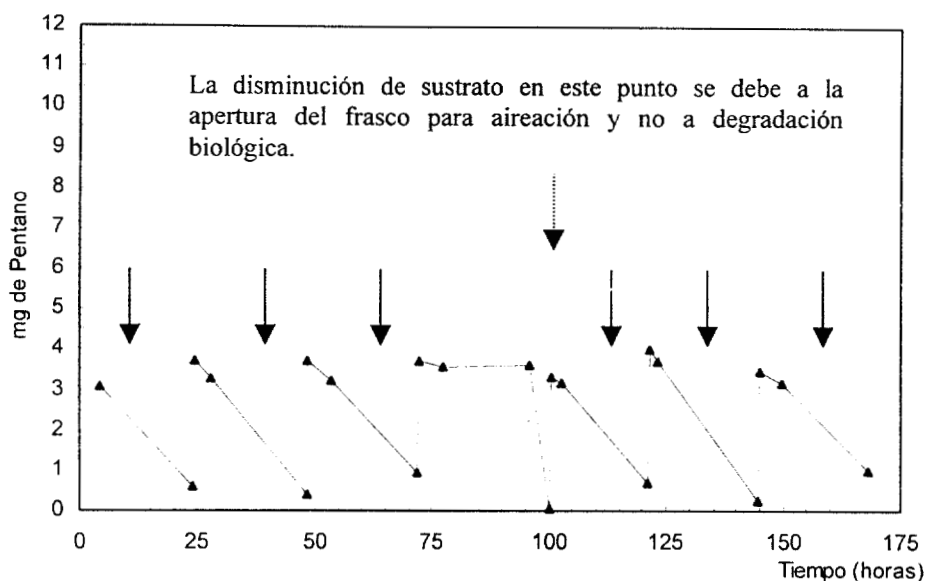
A.3 Experimentos con adiciones sucesivas de sustratos.

Siempre que sea posible modelar los datos experimentales con la ecuación de Gompertz, se hará siguiendo el proceso indicado anteriormente.

En varios experimentos fue necesario hacer adiciones sucesivas de sustrato debido a que la velocidad de consumo del MTBE era comparativamente mucho menor que la de degradación del sustrato, es decir, éste último se consumía en muy poco tiempo y no se observaba una disminución apreciable del MTBE. Después de varias adiciones sucesivas de la fuente de carbono y energía, si se logró en algunos casos observar una degradación cometabólica apreciable del MTBE. Sin embargo esto impidió que la cantidad de sustrato consumido pudiera modelarse de acuerdo con la ecuación de Gompertz.

En la Gráfica A-6 se ilustra un experimento con adiciones sucesivas de pentano. El tiempo de consumo del hidrocarburo era muy corto bajo las condiciones de análisis (aproximadamente un día) por lo que en el tiempo transcurrido entre una adición de sustrato y su agotamiento se pudieron realizar como máximo dos determinaciones. Para poder calcular las velocidades de degradación se hizo la suposición de que la degradación del sustrato en este periodo seguía aproximadamente una línea recta. La pendiente de dicha recta nos indicó la velocidad de desaparición de sustrato (pendiente negativa). La velocidad de **consumo** de sustrato para este intervalo de tiempo será de la misma

magnitud pero con signo positivo. Las unidades de esta velocidad se expresaron como mg de sustrato consumido por hora por mg de proteína.



Gráfica A-2 Experimento de degradación de pentano con adiciones sucesivas del sustrato. El inóculo fue un consorcio bacteriano. Las flechas indican los intervalos donde se determinaron las velocidades de desaparición de sustrato. En estas zonas se consideró que la degradación siguió aproximadamente una línea recta.

Siguiendo el procedimiento anterior para el presente ejemplo, se lograron calcular seis velocidades de consumo de sustrato, de las cuales se seleccionó la mayor y se reporta como la velocidad máxima.

En aquellos experimentos en los que se realizaron adiciones sucesivas de sustrato la velocidad máxima se estimó siguiendo el procedimiento anterior.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA.

1. Acuna-Askar, K.; Englande, A. J.; Hu, C. y Jin, G. (1999) Methyl *tertiary*-Butyl Ether (MTBE) Biodegradation in Batch and Continuous Upflow Fixed-Biofilm reactors. Proceedings of The International Association on Water Quality (IAWQ). Mérida, Yucatán, México. Nov. 14-18.
2. Acuña, M. E.; Pérez, F.; Auria, R. y Revah, S. (1999) Microbiological and Kinetic Aspects of a Biofilter for the Removal of Toluene from Waste Gases. *Biotechnol. Bioeng.* **63**(2):175-183
3. American Petroleum Institute. (API, 1998) Ten frequently asked about MTBE in water: Washington D. C., Health and Safety Department, American Petroleum Institute Soil and Groundwater Research, Technical Bulletin No. 3, 2 p.
4. Ballard, T. y Landwehr, T. (1990) MTBE the benzene of the 90's? *Apex Envirotech, Inc. Sacramento, CA*
<http://www.apexenvirotech.com/MTBE.html>.
5. Bradley, P. M.; Landmeyer, J. E. y Chapelle F. H. (1999) Aerobic Mineralization of MTBE and *tert*-Butyl Alcohol by Stream-Bed Sediment Microorganisms. *Environ. Sci. Technol.* **33**:1877-1879.
6. Celestinos, J. A. (1995) Influencia de la Tecnología en el Medio Ambiente. *Rev. Soc. Quím. Méx.* **39**(2): 51-65.
7. Center for Public Environmental Oversight. (CPEO, 1998) Technologies.
<http://www.cpeo.org/techtree/ttdescript>
8. Church, C.; Tratnyek, P.; Pankow, J.; Landmeyer, J.; Baehr, A.; Thomas, M. y Schrimmer, M. (1999) Effects of Environmental conditions on MTBE degradation in model column aquifers. Proceedings of the technical Meeting U.S. Geological Survey Toxic Substances. Charleston, SC, March 7-12.
9. Criddle, C. S. (1993) The Kinetics of Cometabolism
Biotechnol. Bioeng. **41**:1048-1056.
10. Dalton, H. y Stirling, D. I. (1982) Co-metabolism.
Phil. Trans. R. Soc. Lond. B **297**:481-496.
11. Dean, J. A. (1989) *Lange Manual de Química*. Tomo III. McGraw Hill. México. 1ª Edición en Español.

12. Deeb, R.; Hu, H.Y.; Hanson, J.; Scow, K. y Alvarez, L. (2001) Substrate interactions in BTEX and MTBE mixtures by an MTBE-degrading isolate. *Environ. Sci. Technol.* **35**:312-317.
13. Duetz, W. A.; De Jong, C.; Williams, P. A. y Van Andel, J. G. (1994) Competition in Chemostat Culture between *Pseudomonas* Strains that use Different Pathways for the Degradation of Toluene. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**(8): 2858-2863.
14. Dupasquier, D.; Dreyer, D.; Revah, S. y Auria, R. (1999) Degradation of Methyl *tert*-Butyl Ether (MTBE) Vapors by Cometabolism with Pentane in a Biofilter. Proceedings of The International Association on Water Quality (IAWQ). Mérida, Yucatán, México. Nov. 14-18.
15. EPA (1994-a) Chemicals in the Environment: Methyl-*tert*-Butyl Ether
Office of Pollution Prevention and Toxics.
U.S. Environmental Protection Agency.
EPA 749-F-94-017
http://www.epa.gov/opptintr/chemfact/f_mtbe.txt.
16. EPA (1994-b) Chemical Summary for Methyl-*tert*-Butyl Ether
Office of Pollution Prevention and Toxics.
U.S. Environmental Protection Agency.
EPA 749-F-94-017a
http://www.epa.gov/pootintr/chemfact/s_mtbe.txt.
17. EPA (1995) How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for corrective Action Plan Reviewers.
Extractos del Capítulo II
Office of Underground Storages Tanks
<http://www.epa.gov/swerust1/cat/>
18. EPA (1998) Oxigenates in Water: Critical Information and Research Needs.
Office of Research and Development.
U.S. Environmental Protection Agency.
EPA/600/R-98/048
<http://www.epa.gov/cgi-bin/clarigw>
19. EPA (2000) Methyl-*tert*-Butyl Ether (MTBE). MTBE in fuels.
U.S. Environmental Protection Agency.
<http://www.epa.gov/mtbe/gas.htm>

20. Eweis, J.; Chang, D. P. Y. y Schroeder, E. D. (1997) Meeting the Challenge of MTBE Biodegradation. For presentation at the Air & Waste Management Association's 90th Annual Meeting & Exhibition, June 8-13, Toronto, Ontario, Canada.
21. Eweis, J.; Shroeder, E. D.; Chang, D. P. y Scow, K.M. (1998-a) Biodegradation of MTBE in a Pilot-Scale Biofilter. Preprint of the First International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. To be published by Battelle, Monterey, California. May 18-21.
22. Eweis, J.; Watanabe, N; Shroeder, E. D.; Chang, D. P. y Scow, K.M. (1998-b) MTBE Biodegradation in the presence of Other Gasoline Components. Preprint of Proceedings of the National Groundwater Association. Southwest Focused Ground Water Conference on MTBE and Perchlorate. Anaheim, California, June 3-4, p.55-62.
23. Fayolle, F.; Hernández, G.; Le Roux, F. y Vandecasteele, J. P. (1998) Isolation of two aerobic bacterial strains that degrade efficiently ethyl *t*-butyl ether (ETBE). *Biotechnology Letters* **20**(3):283-286.
24. Fortin, N. Y. y Deshusses, M. (1999-a) Treatment of Methyl *tert*-Butyl Ether Vapors in Biotrickling Filters.1. Reactor Startup, Steady-State Performance, and Culture Characteristics. *Environ. Sci. Technol.* **33**:2980-2986.
25. Fortin, N. Y. y Deshusses, M. (1999-b) Treatment of Methyl *tert*-Butyl Ether Vapors in Biotrickling Filters.2. Analysis of Rate-Limiting Step and Behavior under Transient Conditions. *Environ. Sci. Technol.* **33**:2987-2991.
26. Garnier, P.; Auria, R., Augur, C. y Revah, S. (1999) Cometabolic biodegradation of methyl *t*-butyl ether by *Pseudomonas aeruginosa* grown on pentane. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**:498-503.
27. Garnier, P.; Auria, R., Augur, C. y Revah, S. (2000) Cometabolic biodegradation of methyl *t*-butyl ether by a soil consortium: Effect of components present in gasoline. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **46**:79:84.
28. Grady, C.P. Jr. (1985) Biodegradation: Its Measurement and Microbiological Basis. *Biotechnol. Bioeng.* **27**:660-674.
29. Grady, C.P. (1990) Biodegradation of Toxic Organics: Status and Potential. *J. Environ. Eng.* **116**(5):805-828.
30. Grisham, J. (1999) Cutting Back MTBE. *C & EN* August 2. p 5-6

31. Hanson, D. (1999-a) MTBE: Villain or victim? C & EN October 18: 49.
32. Hanson, J.R.; Ackerman, C.E, y Scow, K.M. (1999-b) Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether by a Bacterial Pure Culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(11): 4788-4792.
33. Hardison, L. K.; Curry, S. S.; Cuiffetti, L. M. y Hyman, M. R. (1997) Metabolism of diethyl ether and cometabolism of methyl *tert*-butyl ether by a filamentous fungus, a *Graphium sp.* *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(8): 3059-3067.
34. Hunt, Roderick. (1982) Plant Growth Curves
1ª Edición. Edward Arnold (Publishers) Limited.
London, Great Britain
35. Horan, C. M. y Brown, E. J. (1995) Biodegradation and inhibitory effects of methyl-*tertiary*-butyl ether (MTBE) added to microbial consortia. *Proceeding of the 10th Annual Conference on Hazardous Waste Research*
<http://www.engg.ksu.edu/HSRC/95Proceed/horan.html>.
36. Kang, J. W.; Hung, H. M.; Lin, A. y Hoffmann, M. R. (1999) Sonolytic Destruction of Methyl *tert*-Butyl Ether by Ultrasonic Irradiation: The role of O₃, H₂O₂, Frecuency, and Power Density. *Environ. Sci. Technol.* **33**:3199-3205.
37. Kharoune, M.; Bouagachel, L.; Pauss, A. y Lebeault, J. M. (1997) Biological and photochemical treatment of the unleaded gasoline oxygenates: MTBE, ETBE and TAME. International Symposium Environmental Biotechnology. Oostende, Belgium. 381-384.
38. Kharoune, M. Y Lebeault, J.M. (2000) Aerobic Biodegradation of an oxygenates mixture: ETBE, MTBE and TAME in an upflow fixed-bed reactor. Aceptado para su publicación en *Water Research*.
39. Leithold, L. (1982) *El Cálculo con Geometría Analítica*.
4ª Edición. Harla. Pp.289-291.
40. Lowry, H. (1951) Protein measurement with the Folin reagent. *J. Bio. Chem.* **193**:265-275.
41. Mehlman, M. A. (1998) Pollution by gasoline containing hazardous methyl *tertiary*-butyl ether. *Archives of Environmental Health.* **53**(4):245.

42. Meynell, G. G. y E. Meynell (1970) *Theory and Practice in Experimental Bacteriology*. 2da. Edición. Univ. Cambridge. 346 p.
43. Mo, K.; Lora, C.; Wanken, A. y Kulpa, C. F. (1995) Biodegradation of MTBE and other oxygenates. *American Society for Microbiology Meeting, Washington, D.C.*
<http://www.nd.edu/~cbpc/kulpa3.html>.
44. Mo, K.; Lora, C.; Javanmardian, M; Yang, X y Kulpa, C. F. (1996) Biodegradation of Gasoline Oxygenate, MTBE by mixed and pure cultures. *American Society for Microbiology Meeting, New Orleans, L.A.*
<http://www.nd.edu/~cbpc/kulpa3.html>.
45. Mo, K.; Lora, C.; Wanken, A. E.; Javanmardian, M.; Yang, X. y Kulpa, C. F. (1997) Biodegradation of methyl *t*-butyl ether by pure bacterial cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**: 69-72.
46. Morales, M. y Deshusses, M. A. and Revah, S. (2000) Microcosm and Column Studies on the Biodegradation of Methyl *tert*-Butyl Ether (MTBE) in Soil-Water Systems. Proceedings of the 93th Annual Meeting and Exhibition of AWMA. Paper 795.
47. Mormile, M. R.; Liu, S. y Suflita, J. M. (1994) Anaerobic biodegradation of gasoline oxygenates: Extrapolation of information to multiple sites and redox conditions. *Environ. Sci. Technol.* **28**(9): 1727-1732.
48. Morse, P.M. (1999) Producers Brace for MTBE Phaseout. *C & EN* April 12: 26-27
49. OECD (1994) *Biotechnology for a Clean Environment. Prevention, Detection, Remediation.* Organisation for Economic Co-Operation and Development. Paris, France.
50. Phelps, P. A.; Agarwal, S. K.; Speitel Jr. G. E. y Georgiou, G. (1992) *Methylosinus trichosporium* OB3b Mutants Having Constitutive Expression of Soluble Methane Monooxygenase in the Presence of High Levels of Copper. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(11): 3701-3708.
51. Prince, R. (2000) Biodegradation of methyl tertiary-butyl ether (MTBE) and other fuel oxygenates. *Critical Reviews in Microbiology.* **26**(3): 163-178.
52. Rhodes, A. (1999) California plans to ban MTBE from Gasoline. *Oil & Gas Journal.* **5**: 39

53. Salanitro, J. P.; Díaz, L. A.; Williams, M. P. y Wisniewski, H. L. (1994) Isolation of bacterial culture that degrades methyl *t*-butyl ether. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**(7):2593-2596.
54. Salanitro, J.P.; Johnson, P.; Spinnler, G.; Maner, P.; Wisniewski, H. y Bruce, C. (2000) Field-Scale demonstration of enhanced MTBE bioremediation through aquifer bioaugmentation and oxygenation. *Environ. Sci. Technol.* **34**(19): 4152-4162.
55. Shields, D. (2000) MTBE: Ningún riesgo para la salud, asegura PEMEX. Sección de Negocios, Periódico El Financiero. Enero 12 p 20.
56. Steffan, R. J.; Mc Clay, K.; Vainberg, S.; Condee, C. W. y Zhang, D. (1997) Biodegradation of the gasoline oxygenates Methyl *tert*-Butyl Ether, Ethyl *tert*-Butyl Ether and *tert*-Amil Methyl Ether by Propane-Oxidizing Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(11): 4216-4222.
57. Suflita, J. M. y Mormile, M. R. (1993) Anaerobic biodegradation of known and potential gasoline oxygenates in the terrestrial subsurface. *Environ. Sci. Technol.* **27**(5): 976-978.
58. Western States Petroleum Association (WSPA, 1998) MTBE: The Basics. <http://www.wspa.org/media/mtbepub1.html>
59. Yang, X.; Tsao, D.; Javanmardian, M. y Glasser, H. A. (1998) Development of Cost-effective MTBE In-Situ treatment technologies. VINTERMØDE OM GRUNDVANDSFORURERING VINGSTEDCENTRET Marts 10-11
60. Yeh, C.K. y Novak, J.T. (1994) Anaerobic biodegradation of gasoline oxygenates in soils. *Water Environ. Res.* **66**(5): 744-752.
61. Yeh, C.K. y Novak, J.T. (1995) The effect of hydrogen peroxide on the degradation of methyl and ethyl *tert*-butyl ether in soils. *Water Environ. Res.* **67**(5): 828-834.
62. Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M. y Van't Riet, K. (1990) Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(6): 1875-1881.