

19

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**ESTUDIO DEL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN
DE Metil Ter-Butil Éter POR CONSORCIOS BACTERIANOS**

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

Presenta:

ISRAEL GARCÍA VEGA

**DIRECTOR DE TESIS: DR. SERGIO REVAH MOISEEV
ASESORA DE TESIS: M. EN C. FRANCISCA LEONORA SÁNCHEZ GARCÍA
FIGUEROA**

**U N A M
F E S
Z A R A G O Z A**



**LO HUMANO ES
DE NUESTRA DESELECCIÓN**

MEXICO, D. F.

2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO BIÓLOGO

ASUNTO: ASIGNACIÓN DE SINODALES.

ESTIMADOS MAESTROS :

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

GARCÍA VEGA ISRAEL

Para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: Estudio comparativo del proceso de biodegradación de Metil Ter-Butil Éter por consorcios bacterianos.

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE M en C. FCA. LEONORA SÁNCHEZ GARCÍA F.

VOCAL* DR. SERGIO REVAH MOISEEV

SECRETARIO, Q.F.I. LEONOR AGUILAR SANTELISES

SUPLENTE Q.B.P. MA. LUISA DELGADO BRISEÑO

SUPLENTE Q.F.B. VICTOR HUGO BECERRA LÓPEZ

ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F., a 26 de septiembre de 2002.

Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ.
JEFE DE LA CARRERA

c.c.p. Departamento de Control de Egresados
c.c.p. Interesado

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

EL PRESENTE TRABAJO FUE

REALIZADO EN EL LABORATORIO DE

EMISIONES GASEOSAS (W-107) DE LA

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA**

BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. SERGIO REVAH MOISEEV

**Y ASESORÍA DE LA M. EN C. FCA. LEONORA SÁNCHEZ
GARCÍA FIGUEROA**

AGRADECIMIENTOS

A MI DIOS

El da esfuerzo al cansado, y multiplica las fuerzas al que no tiene ningunas.

Is. 40:29

Pero los que esperan en Jehová tendrán nuevas fuerza; levantarán alas como las águilas; correrán, y no se cansarán; caminarán, y no se fatigarán.

Is. 40:31

No temas, porque yo estoy contigo; no desmayes, porque yo soy tu Dios que te esfuerzo; siempre te ayudaré, siempre te sustentaré con la diestra de mi justicia.

Is. 41:10

Y si alguno de vosotros tiene falta de sabiduría, pídala a Dios, el cual da a todos abundantemente y sin reproche, y le será dada.

Stg. 1:5

A MI ESPOSA: CRISTINA

A ti que te conocí desde que empecé la carrera y me animaste a terminarla, siempre estuviste en cualquier momento en las buenas y en las malas, por la ayuda que me brindaste en hacer esta tesis porque tu también eres parte de esto.

A MI HIJO: OMAR

Tu fuiste quien me motivo para poder titularme, tu que estuviste en mis brazos al hacer esta tesis y que te sirva de ejemplo que siempre se puede aun en los momentos difíciles y de desesperación.

A MIS PADRES: J. LUIS Y MA. DE LOS ANGELES

Gracias porque siempre me apoyaron incondicionalmente, por los principios y la educación que me dieron y que me ayudaron a ser un hombre de bien y ahora lo podré transmitir a una generación nueva

A MIS HERMANOS: LUIS, ROCIO Y SUSANA

Ustedes que estuvieron a mi lado cuando inicié esto, a ti en especial Toño gracias por esa ayuda tan grande que me diste para terminar y a Rocío y Susana que lo que se propongan lo terminen siempre, lo último que se acaba es la esperanza y el que persevera alcanza.

A LA FAMILIA REYES DÍAZ Y ALICIA REYES CRUZ

Gracias por la ayuda que me dieron al realizar este trabajo

A MI DIRECTOR DE TESIS: Dr. SERGIO REVAH MOISEEV

Por el apoyo recibido y que sin conocerme recibí la confianza para realizar este trabajo

A MI ASESORA: M. en C. FCA. LEONORA SÁNCHEZ GARCÍA FIGUEROA

Por la inducción, las aportaciones, comentarios realizados a este trabajo y su fiel apoyo

A MIGUEL MAGAÑA

Gracias por que de ti aprendí demasiado, estos conocimientos no se aprenden en la carrera, por el desarrollo de este trabajo y que me brindaste tu ayuda incondicional para terminarlo, te lo debo.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES- ZARAGOZA

Por la oportunidad que me dio, para ser un hombre de bien y así poder hacer bien a mi país

A LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO- IZTAPALAPA

Por las instalaciones prestadas durante el desarrollo de este trabajo

A LA AGENCIA DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL DEL JAPÓN (JICA)

Por el apoyo económico otorgado en la realización de este trabajo

Cuanto más altos estemos situados, más humildes debemos ser.

ÍNDICE

	PAGINAS
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	6
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
4. OBJETIVOS	21
5. HIPÓTESIS	22
6. TIPO DE ESTUDIO	23
7. POBLACIÓN Y CRITERIOS	23
8. MATERIAL Y MÉTODO.....	24
9. RESULTADOS	33
10. DISCUSIÓN	39
11. CONCLUSIONES	42
12. ANEXOS.....	44
13. BIBLIOGRAFÍA	51

INTRODUCCIÓN

Las Enmiendas de la Ley de Aire Limpio (Clean Air Act Amendments CAAA), dieron lugar a dos programas de combustibles administrados por la Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA). Estos programas requieren el uso de oxigenantes para incrementar el contenido de oxígeno de los combustibles y reducir ciertas emisiones durante la combustión.

El primer objetivo de este programa fue reducir las emisiones de monóxido de carbono en donde los estándares de calidad del aire no fueran rebasados (Hanson1999-a Yang y col. 1998). El segundo programa, requirió del uso de gasolinas reformuladas conteniendo el 2 % en peso de oxígeno.

Al final de la década de los 70's, la Agencia de Protección del Ambiente (EPA) de los Estados Unidos, empezó a proteger la salud publica a través de cambios en la formulación de las gasolinas, como consecuencia se eliminaron los aditivos de plomo que se usaban como mejoradores del índice de octano y se sustituyeron en su mayoría por metil ter-butil éter (MTBE).^{1,2,3}

El metil ter-butil éter (MTBE) en la gasolina

El uso del MTBE en la gasolina fue aprobado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) en los 80's. En la última década, la producción y la adición de MTBE a la gasolina se ha incrementado significativamente por lo que en 1990 las Enmiendas de la Ley de Aire Limpio (Clean Air Act Amendments CAAA) autorizó el uso de gasolina reformulada y oxigenada en ciertas regiones urbanas para reducir la contaminación del aire causada por los motores de los vehículos.

Se calcula que el MTBE es actualmente el oxigenante más comúnmente adicionado a la gasolina y se emplea en concentraciones superiores al 15 % (v/v) en más del 30 % de la gasolina vendida en los Estados Unidos de América^{4,5}.

El metil ter-butil éter (MTBE) en México

En México se efectuaron cambios en la composición de la gasolina. En el invierno de 1993, se sustituyó el tetraetil de plomo por metil ter-butil éter (MTBE) (9 % en volumen) en la gasolina Magna Sin y es equivalente a la gasolina regular sin plomo con un índice de 87 octanos.

En México PEMEX ha construido plantas para la producción de los aditivos oxigenantes (metil ter-butil éter MTBE y ter-amil metil éter TAME) en Tula, Salamanca, Cadereyta y Salina Cruz. Actualmente, México adiciona MTBE a todas sus gasolinas y también realiza importaciones de MTBE.

En enero del 2000 Jaime Mariano 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 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."⁶

Propiedades del MTBE

El MTBE (Figura 1.1) es un compuesto altamente soluble en agua (4.8×10^4 mg/L a 20 °C), es miscible en gasolina, alcohol y éter. Tiene una alta presión de vapor (3.35×10^4 Pa a 25°C).

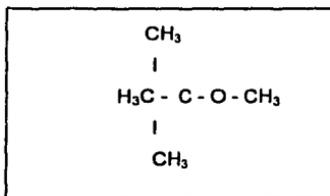


Figura 1.1 Metil ter-butil éter (MTBE)

Estas propiedades fisicoquímicas le confieren al MTBE la capacidad de dispersarse tanto en aguas superficiales como en aguas subterráneas y puede volatilizarse y contaminar la zona vadosa, superficie del suelo y los sedimentos.^{5,7}

Toxicidad

En un inicio el MTBE fue visto como un compuesto químico muy seguro debido a que su toxicidad es baja y es ligeramente carcinogénico a dosis muy altas en animales de laboratorio, pero de hecho, menos que otros componentes de la gasolina. Como aditivo de la gasolina resulta en un alto valor de referencia de octano y es muy soluble en la gasolina.

Actualmente la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos de América, en lista al MTBE como un posible cancerígeno: sin embargo los límites de toxicidad aún son objeto de debates. Desde que el MTBE se detectó en concentraciones muy bajas (35 µg/L), la EPA ha recomendado mantener su concentración en agua potable por debajo de los límites de 40 µg/L.^{1,8,9}

De acuerdo a los estudios de la Academia Nacional de Ciencias (National Academy Sciences NAS), el MTBE causa enfermedades respiratorias (asma, bronquitis) y enfermedades alérgicas. Se han reportado enfermedades neurológicas incluyendo dolor de cabeza, ansiedad, falta de concentración, insomnio y depresión. Estudios en animales mostraron que el MTBE es probablemente un carcinógeno humano y causa diferentes tipos de cáncer como leucemia y linfoma, y 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) y el tetrabutil alcohol (TBA). 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.

Estudios de laboratorio muestran que respirar grandes cantidades de MTBE por períodos cortos de tiempo tiene efectos adversos en el sistema nervioso y efectos adversos en fetos de los animales, hiperactividad e incoordinación hasta convulsiones e inconsciencia, en el humano causa daños en el riñón.^{10,11,12}

Aunque aún no se ha comprobado que el MTBE cause enfermedades en el ser humano, cuando el agua contiene 40 partes por millón se aprecia un sabor y olor fétido en el líquido, por lo que las regulaciones concernientes a la

contaminación con MTBE se han incrementado al igual que las investigaciones para disminuir la contaminación causada por dicho compuesto.

Sin embargo otros investigadores aseguran que el efecto del MTBE en la salud de los humanos y en el ambiente depende de cuanto MTBE está presente y de la duración y frecuencia de la exposición. Los efectos también dependen de las condiciones de salud de las personas o de las condiciones ambientales cuando la exposición a este compuesto ocurre.¹³

El metil ter-butil éter en el ambiente

Como la mayoría de los otros componentes de la gasolina, la liberación del MTBE al medio ambiente ocurre en sitios involucrados en su manufactura, mezclado con la gasolina, durante el almacenamiento o distribución, en fugas de tanques o derrames de gasolineras. Así el MTBE ha sido detectado en el aire urbano, en aguas superficiales, en aguas fluviales y en aguas subterráneas.

Mientras que la vida media del MTBE en la atmósfera y en aguas superficiales es relativamente corta (en el orden de días), la vida media en sistemas subterráneos es larga (en el orden de años). En realidad se ha demostrado que el MTBE permanece en mantos acuíferos y que pequeñas cantidades de MTBE se desplazan a velocidades comparables al flujo de las aguas subterráneas.

La movilidad del MTBE en el subsuelo se debe en parte a su alta solubilidad en agua y a su estructura química la cual es relativamente resistente al ataque microbiano.¹⁴

Biodegradación

Se ha encontrado que existen varias especies capaces de biodegradar al MTBE por cometabolismo, pero muy pocas son capaces de emplearlo como única fuente de carbono y energía, asimismo, varios estudios señalan a las condiciones aerobias como una mejor alternativa para estudios posteriores.

De acuerdo a los estudios realizados para la biodegradación del MTBE, se ha concluido que esta conduce a la formación de TBA, un intermediario que

finalmente puede ser degradado hasta la formación de agua y dióxido de carbono (H_2O y CO_2).¹⁵

El propósito de este trabajo

En éste trabajo, se tiene como propósito, demostrar la biodegradación de MTBE por consorcios bacterianos que utilicen al MTBE como única fuente de carbono y energía bajo condiciones aeróbicas, para plantear estrategias de biorremediación en sitios contaminados por esta sustancia.

ANTECEDENTES

Biodegradación significa la transformación biológica de un compuesto orgánico a otra forma química. La biodegradación también podría convertir un compuesto químico inocuo en un compuesto tóxico, cambiar un compuesto fácilmente metabolizable en uno que es difícil de destruir, o alterar la toxicidad de un compuesto para que este actúe contra otros organismos. Sin embargo cuando los científicos e ingenieros establecen que un compuesto es biodegradable, por lo general se refieren a que dicho compuesto puede ser mineralizado. La biodegradación primaria es comúnmente utilizada para denotar una única transformación mientras que la biodegradación parcial es considerada como un paso entre la biodegradación primaria y la mineralización.¹⁶

Los compuestos orgánicos son frecuentemente clasificados como biodegradables, persistentes o recalcitrantes. Aunque el término recalcitrante ha sido utilizado con un sin número de significados, algunos investigadores lo han definido como la resistencia inherente de un compuesto químico a algún grado de biodegradación y han introducido el término persistente para significar que un compuesto químico no responde a la biodegradación bajo un conjunto de condiciones específicas. Lo importante es que un compuesto químico puede ser biodegradable inherentemente y todavía aún persistir en el ambiente. El reconocer esto es el factor clave para establecer las condiciones bajo las cuales dirigir las pruebas de biodegradación.^{17,18}

La clave para asegurar la eliminación de las sustancias orgánicas del ambiente es la evaluación real de su susceptibilidad a la mineralización (la conversión a dióxido de carbono, agua, y a varias formas inorgánicas), lo cual por lo general se logra como consecuencia de la actividad microbiana. Se conoce poco, acerca de la biodegradación del MTBE. Sin embargo, a pesar de esto algunos investigadores han demostrado que efectivamente el MTBE puede ser degradado en el laboratorio bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas utilizando

cultivos de microorganismos puros o mixtos con tiempos de vida media de 0.4 a 29 días, incluso se han desarrollado investigaciones con microcosmos en condiciones aeróbicas y en mantos acuíferos contaminados con MTBE.^{19,20}

El cometabolismo ha sido definido recientemente como "La transformación de un sustrato que no permite el crecimiento solo bajo la presencia obligada de un sustrato de crecimiento u otro compuesto transformable." Hay dos conceptos claves asociados con esta definición. Primero, un sustrato de no crecimiento es definido como uno que no soporta la división celular. En otras palabras es uno que no sirve como fuente única de carbono y energía para un cultivo puro. Segundo, la transformación aparecerá solo en la presencia obligada de un sustrato de crecimiento.^{21, 22}

Un sustrato de crecimiento es definido como un donador de electrones que proporciona un poder reductor de energía para que crezcan y se mantengan las células. Algunas enzimas cometabólicas y cofactores son inducidos por sustratos de crecimiento, aunque los agentes metabólicos pueden ser también inducidos por otros factores o bien pueden ser producidos constitutivamente. Aunque el término cometabolismo tradicionalmente ha sido aplicado a oxidaciones, muchas reacciones reductivas también satisfacen la definición de cometabolismo y estas transformaciones dependen de los sustratos de energía o de crecimiento utilizados.^{18,21,23}

Mo K. y col. (1995) aislaron 15 cepas puras de bacterias de lodos biotratados y de otras fuentes con la capacidad de degradar al MTBE cuando este es su única fuente de carbono. Siete cepas fueron clasificadas como pertenecientes al género de *Rhodococcus*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* u *Oerskovia*. Esos cultivos degradaron arriba del 40 % de 200 ppm de MTBE en 1-2 semanas de incubación a 22-25 °C. Esas cepas también crecieron en t-butanol, butilformato, isopropanol, acetona y piruvato como únicas fuentes de carbono. El uso de esos compuestos en combinación con el MTBE, mostraron una reducción

en la degradación del MTBE. Sin embargo, el precrecimiento en t-butanol continuado en medio que contenía MTBE, dio como resultado una mayor degradación de MTBE. También se utilizó MTBE marcado con carbono catorce para determinar la evolución del CO₂ marcado con carbono catorce. En menos de siete días de incubación, se desarrolló una significativa radioactividad, como ¹⁴CO₂. El crecimiento de algunos aislamientos en MTBE es muy lento, sin embargo, en algunas instancias ocurre muy poco incremento en el número de células aun con la degradación del MTBE.²⁴

Horan M. y Brown J. (1995) afirmaron que el destino ambiental y los efectos biológicos del oxigenante de la gasolina metil ter-butil éter (MTBE), es importante debido a una gran cantidad de factores como lo es su alta solubilidad en agua. Así la contaminación de agua superficial y subterránea puede ocurrir por exposiciones accidentales y derrames. Se conoce poco acerca de la biodegradación y ecotoxicidad del MTBE. Estos autores encontraron que el MTBE adicionado a consorcios microbianos limitados de carbono incrementaron su consumo de oxígeno pero que las concentraciones cercanas a 740 mg/L inhibieron el potencial de mineralización de otros constituyentes de la gasolina (hexadecano) por arriba del 50 %. Esos resultados indicaron que el MTBE puede ser metabolizado en el ambiente pero que la toxicidad puede afectar adversamente en la biodegradación global de los hidrocarburos constituyentes de la gasolina líquida.²⁵

Mo K, y col. (1996) reportaron la biodegradación de MTBE. Ellos trabajaron con un cultivo mixto que obtuvieron de lodos biológicos, los cuales también han sido descubiertos en bioreactores utilizando MTBE como única fuente de carbono por más de un año. Los reactores han mantenido una actividad estable para la degradación de MTBE. La velocidad de degradación del MTBE se ha incrementado regularmente con el almacenamiento en un reactor, el cultivo mixto degradó 160 ppm de MTBE después de tres días de incubación en un conjunto de experimentos. Comparado con cultivos puros, los cultivos mixtos han mostrado

una mayor capacidad de degradación de MTBE. Estos cultivos mixtos también son capaces de degradar otros oxigenantes (ETB y TAME) a temperatura ambiente. La visión de otros éteres causa una aparente reducción de la degradación de MTBE.^{24,26}

Steffan J, y col. (1997) evaluaron varias bacterias propano oxidantes en cuanto a su capacidad de degradar algunas sustancias oxigenantes de la gasolina, incluyendo metil ter-butil éter (MTBE), etil ter-butil éter (ETBE) y metil ter-amil éter (TAME). Tanto las cepas del laboratorio como los aislamientos naturales fueron capaces de degradar cada compuesto después de crecer en propano. Cuando la cepa ENV425 crecida en propano fue incubada con 20 mg de [¹⁴C]MTBE marcado uniformemente por litro, la cepa convirtió más del 60 % del MTBE adicionado en ¹⁴CO₂ en menos de 30 h. La oxidación inicial de MTBE y ETBE dio como resultado la oxidación casi estequiométrica de alcohol ter-butílico (TBA), mientras que la oxidación inicial TAME dio como resultado la producción de alcohol ter-amílico. El grupo metil metoxi del MTBE fue oxidado a formaldehído y finalmente a CO₂, el TBA fue oxidado finalmente a 2-metil-2-hidroxi propanol y después a ácido 2-hidroxi butírico; sin embargo, ninguno de esos productos de degradación fue un efectivo sustrato de crecimiento para los propano oxidantes. El análisis de las células extraídas de ENV425 y los experimentos con inhibidores enzimáticos implicados en la oxidación de la enzima soluble T-450 tanto de MTBE y TBA, el MTBE fue oxidado TBA por *Pseudomona putida* crecidas en alcanfor CAM, la cual produce la bien caracterizada P-450cam, pero no por *Rhodococcus rhodochrous* 116, el cual produce dos enzimas P-450. La velocidad de degradación de MTBE con cepas propano oxidantes estuvo en un rango de 3.9 a 9.2 nmol/min/mg de proteínas celulares a 28 °C, mientras que el TBA fue oxidado a una velocidad de sólo 1.8 a 2.4 nmol/min/mg de proteínas celulares a la misma temperatura.^{3,27}

Mo y col. (1997) aislaron tres cultivos puros: *Methylobacterium mesophilicum* (ATCC700107), *Arthrobacter ilicis* (ATCC 700109) y *Rhodococcus*

sp. (ATCC 700108) de muestras de lodos activados, de la fruta del árbol Gingko, y de los suelos que rodean al árbol, los cuales utilizaron como sustrato de enriquecimiento MTBE. El árbol Gingko desde que se encontró se pensó que produce grupos butil terciarios en sus frutas. Los tres cultivos mostraron una biotransformación del 29 % de 200 mg/L MTBE en menos de dos semanas con 8 % de MTBE mineralizado a CO₂ al final de la primera semana (densidades del inoculo = $5 \cdot 10^5$ – $5 \cdot 10^7$ UFC/mL). La velocidad de degradación del MTBE disminuye significativamente en presencia de otras fuentes de carbono incluyendo TBA, TBF, iso-propanol, acetona y piruvato. Se observaron velocidades lentas de crecimiento en MTBE lo cual condujo a los investigadores a concluir que el MTBE también es un sustrato de pobre crecimiento o que uno de sus metabolitos puede inhibir el crecimiento del cultivo.^{26,28}

Eweis y col. (1997) reportaron la eliminación de MTBE en un biofiltro en una planta de control de la contaminación del agua en la ciudad de los Angeles. Esos investigadores enriquecieron un cultivo mixto de material de biofiltro, compuesto principalmente de composta comercial, que fue capaz de utilizar MTBE para crecer. Se encontró que la actividad del consorcio está en función del pH y que la actividad disminuye más allá de un rango de pH de 6.5 a 7.8. La velocidad de degradación de MTBE en cultivo líquido se incrementó de 0.031 a 0.062 mg/L/d con un incremento en la biomasa; sin embargo, la cantidad de biomasa no fue cuantificada en este estudio. Se demostró que el cultivo también degrada tolueno y metanol. Bajo condiciones óptimas, la velocidad de degradación de TBA fue ligeramente mayor que la de MTBE y no se observó acumulación de TBA durante la biodegradación de MTBE. Dos cultivos puros capaces de degradar MTBE fueron aislados de este consorcio (Hanson y col. 1999).^{26,29}

Eweis y col. (1997 y 1998) trabajaron con un biofiltro de composta de la planta de control de la contaminación del agua en la ciudad de los Angeles en el distrito de sanitización, este biofiltro estuvo tratando sistemas de aire contaminado con MTBE y otros hidrocarburos para la eliminación de MTBE después de una

fase de retraso de un año. Concentraciones por arriba de 200 ppm de MTBE en una fase gaseosa fueron eliminados con un promedio de eficiencia del 90 %. La velocidad de eliminación del MTBE fue estimada para ser de 6 a 8 g/m³ volumen del reactor/h. Cultivos mixtos y puros derivados de un material de biofiltro crecieron en MTBE como única fuente de carbono y energía. Un biofiltro a escala piloto que contenía una matriz de cerámica inerte fue secuencialmente inoculada con el cultivo mixto y operada con una entrada de concentraciones de aire de 30 a 40 ppm de MTBE. Después de una fase de aclimatación de 10 semanas la eficiente eliminación de MTBE en este reactor fue reportada de 95 %.^{29,30}

Fortin (1997) y Deshusses (1998, 1999a, b), en estudios que ellos realizaron, fue enriquecido un cultivo mixto de dos degradadores de MTBE en filtros de biotrapas. Se demostró que este consorcio degrada altas concentraciones de MTBE y TBA (arriba de 550 y 800 mg/L, respectivamente) en un grupo de reactores. Inicialmente, sustancias de turba húmica (500 mg STH/kg MTBE) fueron adicionadas para la estabilización del cultivo. Esto sugirió que los ácidos húmicos podrían formar complejos con el MTBE, por lo tanto, mejora la velocidad de aceptación microbiana. A concentraciones de 50 a 800 mg/L, el MTBE y TBA fueron degradados a una velocidad de 1 - 3 mg/L/h. La formación de TBA durante la biodegradación no dio indicios de que el TBA fuera degradado más rápido que el MTBE. Las velocidades de crecimiento específicas (0.023 – 0.026 /d) y producción celular (0.09 – 0.12 g células/g MTBE) en MTBE fueron bajos pero consistentes con valores obtenidos de otros estudios de MTBE.^{31,32}

Salanitro y col (1998) han reportado estudios de microcosmos para la biodegradación de MTBE en suelo y/o muestras de aguas subterráneas obtenidas de sitios contaminados con MTBE. En los estudios que utilizaron muestras de agua subterránea de dos pozos de una terminal de Nevada, las concentraciones de MTBE es 5 a 80 mg/L fue degradada siguiendo un periodo de retraso de 2 a 3 semanas a una velocidad de 0.1 a 0.32/d. En muestras de suelos y aguas subterráneas de un lugar de New Jersey, el MTBE fue degradado en una

velocidad de 0.28 mg/L/d con una vida media de 21 días. Una observación conducida a evaluar la presencia de la velocidad de degradación del MTBE que ocurre de manera natural en 10 sitios contaminados con gasolina localizados a las orillas de los Estados Unidos indicaron que las poblaciones de microorganismos que degradan MTBE fueron bajas en los ambientes de la superficie con concentraciones que fueron típicamente por abajo de 10^3 /g de suelo o 100/L aguas subterráneas.²⁶

Hanson R, y col. (1999), trabajaron con una cepa bacteriana PM1; la cual es capaz de utilizar MTBE como única fuente de carbono y energía, fue aislada de un consorcio mixto microbiano en un biofiltro de composta capaz de degradar MTBE. La velocidad de degradación lineal de MTBE por 2×10^6 células mL^{-1} fueron 0.07, 1.17 y 3.56 $\mu\text{g mL}^{-1}\text{h}^{-1}$ para concentraciones iniciales de 5,50 y 500 $\mu\text{g MTBE mL}^{-1}$, respectivamente. Cuando se incubaron con 20 $\mu\text{g } [^{14}\text{C}] \text{ MTBE mL}^{-1}$, la cepa PM1 convirtió 46 % de $^{14}\text{CO}_2$ y 19 % de células marcadas- ^{14}C en menos de 120 h. Este rendimiento es consistente con la medida de la acumulación de proteínas a diferentes concentraciones de MTBE de las cuales se estimó un rendimiento de biomasa de 0.18 mg de células mg MTBE^{-1} . La cepa PM1 fue inoculada dentro del corazón del material del sedimento obtenido de aguas subterráneas de Port Hueneme, California, en la cual no hubo evidencia de degradación de MTBE. La cepa PM1 rápidamente degradó 20 μg de MTBE mL^{-1} adicionado al material de corazón. La velocidad de remover MTBE se incremento con la entrada adicional de 20 μg de MTBE mL^{-1} . Esos resultados sugieren que PM1 tiene el potencial para ser utilizado en la remediación de ambientes contaminados con MTBE.^{27,33}

Acuna-Askar y col. (1999) realizaron experimentos en los que el MTBE fue biodegradado efectivamente bajo condiciones ambientales de oxidación en presencia de un cultivo mixto aclimatado, aislado de un biotratador petroquímico. MC-1 (*coccus gram positivo*), MC-2 (*Acinetobacter lwoffii*) y MC-3 (*Bacillus sp.*) estuvieron presentes en el medio de cultivo, con MC-1 siendo el microorganismo predominante. La presencia de otras fuentes de carbono fácilmente asimilables en

el medio de cultivo influenciaron la biodegradación de MTBE. En un grupo de estudios 62-73 % de MTBE fue biodegradado en 144 -192 horas en una concentración inicial de 100 ppm como única fuente de carbono, con el ORP un rango de 191-274 mv, y a una temperatura de 29 °C . La constante K global de la velocidad y la constante específica de la velocidad fueron evaluadas con una ecuación de la velocidad de primer orden. El promedio de los valores determinados fueron $1.79 \cdot 10^{-1} \text{ día}^{-1}$ y $1.66 \cdot 10^{-2} \text{ día}^{-1}/(\text{mg/L masa celular})$, respectivamente. Estudios de flujo continuo en una biocapa fijada de un reactor fueron desarrollados a tiempos de retención de 0.25, 0.5 y 1 día a una concentración inicial de MTBE de 150 ppm. Los resultados indicaron que aproximadamente el 53 % de MTBE fue degradado por un tiempo de retención de 0.25-día y 70 % tanto para ambos tiempos de retención 0.5 y 1.0-día. Se evaluaron tres modelos de cinéticas para todos los tiempos de retención experimentales. Esos incluyeron: modelo 1 (Eckenfelder); modelo 2 (Arvin) y modelo 3 (bifásico de primer orden). Los resultados indicaron que el modelo 3 tuvo un rendimiento de los más alto y más consistentes coeficientes de correlación de todos los tiempos de retención evaluados.³⁴

Morales M. y col. (2000), llevaron a cabo experimentos de microcosmos y de columna utilizando suelos y aguas subterráneas de sitios contaminados con MTBE, empleando agua destilada complementada con sales minerales. La degradación de MTBE en microcosmos fue probada bajo condiciones aerobias y anaerobias con una concentración inicial de MTBE de 25 mg/L el agua del suelo tuvo un rango en los experimentos de microcosmos de 1:2 por masa y el tamaño del inóculo fue de 0.3 g de peso de biomasa/50 mL líquido. No se observó degradación de MTBE en microcosmos incubados, sólo con una población microbiana endógena o bajo condiciones anaeróbicas. La degradación de MTBE fue observada únicamente en microcosmos bajo condiciones aeróbicas e inoculadas con el consorcio degradador de MTBE . En esos microcosmos, la degradación completa de MTBE fue observada aproximadamente en 10 días. Un decremento en la velocidad de degradación de MTBE fue observado comparado a

experimentos previos desarrollados a 30 °C en un agitador y sin tierra. También se observó un decremento en la velocidad de biodegradación de MTBE con un tiempo, el cual fue probablemente debido a la acumulación de nitrito y al pH bajo resultado de la nitrificación de amonio. Subsecuentemente, una columna de 0.7 L fue rellena con el mismo suelo y aguas subterránea sintética con una concentración de MTBE de 13 ppm que fue inyectada a través de la columna mientras se mantenían las condiciones aeróbicas. La columna de suelo fue operada por más de seis meses a una carga variable de MTBE que se remueve eficientemente hasta permanecer cerca del 100 %. Se llevaron a cabo experimentos utilizando MTBE radiomarcado. En la columna de suelo, se liberó una carga rápida de $^{14}\text{CO}_2$ que fue observada en menos de 24 h después de la inyección de ^{14}C -MTBE. El $^{14}\text{CO}_2$ fue recuperado aproximadamente el 10 % de la radioactividad inyectada. Finalmente una respuesta rápida del sistema fue encontrada cuando el MTBE suministrado es cerrado y abierto otra vez. Los resultados son muy prometedores para futuras aplicaciones en la biorremediación de MTBE.²⁰

Deeb A. y col. (2000) realizaron una revisión de la bibliografía actual de la biodegradación aeróbica del MTBE la cual revela que un gran número de cultivos de diversos ambientes pueden degradar parcial o completamente al MTBE hasta mineralizarlo. El MTBE también es utilizado como única fuente de carbono y energía y puede ser degradado cometabólicamente por cultivos que crecen en alcanos. El rango reportado de las velocidades de degradación es de 0.3 a 50 mg de MTBE/g de células/h mientras que la velocidad de crecimiento es de 0.01 – 0.05g MTBE/g células/d y la producción celular es 0.1- 0.2g de células/g MTBE los cuales son generalmente bajos. Estudios en los mecanismos de degradación de MTBE indican que las enzimas monooxigenasas rompen los enlaces de éteres formando alcohol ter-butílico (TBA) y formaldehído como los principales intermediarios detectables. El TBA es posteriormente degradado a 2-metil-2-hidroxi-1-propanol, ácido 2,2-hidroxiisobutírico, 2-propanol, acetona, hidroxiacetona y eventualmente dióxido de carbono. La mayoría de estos

intermediarios también son comunes en el metabolismo de los mamíferos. Estudios de laboratorio acerca de la degradación de MTBE en presencia de compuestos aromáticos de la gasolina por lo general no son inhibidos por el MTBE, la degradación del MTBE podría ser inhibida por la presencia de compuestos más fáciles de degradar. Basados en los estudios revisados, es probable que las estrategias de biorremediación involucran el metabolismo directo, cometabolismo o alguna combinación de ellos, con ello podría ser aplicado de manera factible y con un costo-beneficio un método para el tratamiento de la contaminación con MTBE.^{26,25}

Fortin Y, Morales M, y col. (2001) estudiaron las características de un consorcio que degrada MTBE en un medio de cultivo líquido. La velocidad de degradación de MTBE fue rápida y seguida por una cinética de orden cero donde se adicionaron 100 mg L⁻¹. La concentración residual de MTBE en un grupo de experimentos de degradación estuvieron en un rango por debajo del límite de detección (1 µg L⁻¹) a 50 µg L⁻¹. La actividad específica del consorcio estuvo en un rango de 7 a 18 mg_{MTBE} g_{d.w.}⁻¹h⁻¹. Experimentos con radioisótopos mostraron que 79 % de carbono-MTBE fue convertido a carbono-dióxido de carbono. El consorcio fue capaz de degradar una variedad de hidrocarburos incluyendo alcohol ter-butílico (TBA), metil ter-amil éter (TAME) y constituyentes de la gasolina tales como benceno, tolueno, etil benceno y xileno (BTEX) el consorcio también fue caracterizado con una velocidad de crecimiento muy lenta (0.1 d⁻¹), un rendimiento de biomasa global (0.11 g_{d.w.} g⁻¹_{MTBE}), una alta afinidad por el MTBE y una baja afinidad por oxígeno, lo cual quizá sea una razón para la baja o ausente biodegradación de MTBE *in situ*.³⁶

Hasta la fecha se han reportado varias investigaciones de cultivos puros y mixtos, degradadores de oxigenantes capaces de crecer y de utilizarlos como única fuente de carbono y energía, los cuales son resumidos en la tabla 2.1.

De acuerdo a los estudios realizados para la biodegradación del MTBE, se ha concluido que esta conduce a la formación de TBA, un intermediario que finalmente puede ser degradado hasta la formación de agua y dióxido de carbono (H_2O y CO_2), en la tabla 2.2 se muestra un resumen comparativo de la degradación de MTBE y TBA. En la figura 2.1 se muestran las rutas de biodegradación del MTBE.^{22,37}

TABLA 2.1 Velocidad de degradación de oxigenantes por cultivos de microorganismos puros y mixtos. *Nd* no determinado

Microorganismo o consorcio	Fuente de carbono	Velocidad de degradación de MTBE (nmoles.min ⁻¹ .mg protein ⁻¹)	Velocidad de degradación de TBA (nmoles.min ⁻¹ .mg protein ⁻¹)	Velocidad de degradación de ETBE (nmoles.min ⁻¹ .mg protein ⁻¹)	Referencia
Cultivo BC-1	MTBE	13	6.3 ^b	Nd	Salanitto y col.
<i>Graphium sp</i>	Butano	0.35 ^b	+ (Nd)	Nd	Haardison y col.
<i>P. putida</i> CAM	Alcanfor	0.4 ^a	Nd	Nd	Steffan y col.
<i>M. vaccae</i> JOB5	Propano	+ (Nd)	+ (Nd)	+ (Nd)	Steffan y col.
Cepa ENV 425	Propano	4.6 ^a	1.8a	+ (Nd)	Steffan y col.
Cepa ENV 421	Propano	9.2 ^a	2.4a	+ (Nd)	Steffan y col.
<i>P. aeruginosa</i>	Pentano	3.9 ^a	0.95a	Nd	Garnier y col.
<i>M. vaccae</i> JOB5	Hexano	21.0 ^a	Nd	Nd	Hyman y O'Reilly (1999)
<i>M. vaccae</i> JOB5	2-metilpentano	17.1 ^a	Nd	Nd	Hyman y O'Reilly (1999)
<i>A. eutrophus</i>	Butano	15.0 ^a	Nd	Nd	Hyman y O'Reilly (1999)
<i>A. eutrophus</i>	2-Metilbutano	14.9 ^a	Nd	Nd	Hyman y O'Reilly (1999)
<i>P. mendocina</i>	2-Metilpentano	4.0 ^a	Nd	Nd	Hyman y O'Reilly (1999)
Ciclohexano – utilizando cultivo	Ciclohexano	2.4 ^b	0.46 ^b	0.62 ^b	Corcho y col. (2000)
<i>Rubrivirex sp.</i> PM-1	MTBE	19 ^b	+ (Nd)	Nd	Deeb y col (2000)
<i>G. terrae</i> IFP 2001	ETBE	14 ^b	No degradación	59 ^b	Hernandez-Perez y col. (2001)
<i>G. terrae</i> IFP 2007	Etolanol	15.6 ^b	No degradación	Nd	Piveteau y col. (2000)
<i>B. cepacia</i> IFP 2003	TBA	No degradación	16 ^b	No degradación	Piveteau y col. (2001)
<i>Rhodococcus sp</i> CT2	Propano	11.7 ^a	Nd	Nd	Hyman y col. (2000)
<i>Rhodococcus sp</i> CT2	Pentano	18.3 ^a	Nd	Nd	Hyman y col. (2000)
<i>Rhodococcus sp</i> CT2	Isobutano	4.6 ^a	Nd	Nd	Hyman y col. (2000)
<i>Hydrogenophaga flava</i> ENV 735	MTBE	46 ^a	+ (Nd)	Nd	Steffan y col. (2000b)

^a Valor dado en la referencia

^b Cálculo de datos publicados por comparación, considerando el contenido de proteínas en las células del 50%

^c Complementado con 100 mg l⁻¹ de extracto de levaduras

FUENTE: Fayolle F. y col (2000)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 2.2. Resumen comparativo de la velocidad de degradación de MTBE y TBA por cultivos obtenidos de fuentes ambientales

Referencia	Notas	Velocidad de degradación de MTBE	Velocidad de degradación de TBA
Salanitro y col., 1994	Cultivo mixto (BC-1) MTBE fue utilizado para el crecimiento TBA no fue útil como sustrato de crecimiento TBA fue acumulado durante la degradación de MTBE	34 mg/g células/h	14 mg/g células/h
Park y Cowan 1997 a,b	Cultivo mixto (BC-1) MTBE y TBA fueron utilizados para el crecimiento TBA fue acumulado durante la degradación de MTBE	MTBE>TBA NR ^a	TBA < MTBE NR ^a
Fortin y col., 1997	MTBE y TBA fueron utilizados para el crecimiento TBA no fue acumulado durante la degradación de MTBE	1.1-2.6 mg/L/h ^b	1.8-2.8 mg/L/h ^b
Church y col., 2000 Deeb y col., 2000 a,b	Cultivo puro (PM1) MTBE y TBA fueron utilizados eficazmente para el crecimiento	2.16 x 10 ² mM/h ^b	2.96 x 10 ² mM/h ^b
Hanson y col., 1999 Hyman y col., 1998	TBA no fue acumulado durante la degradación de MTBE Cultivo puro (<i>Xanthobaacter sp.</i>) MTBE y TBA fueron degradados cometabólicamente	5.9-15 nmol/min/mg proteínas	3.1 nmol/min/mg proteínas
Steffan y col., 1997	Cultivos puros (ENV425 y ENV 421) MTBE y TBA fueron degradados cometabólicamente	2.1-9.2 nmol/min/mg proteínas	1.3-2.4 nmol/min/mg proteínas
Garnier y col., 1999	Cultivo puro (<i>Pseudomona aeruginosa</i>) MTBE y TBA fueron degradados cometabólicamente	3.9 nmol/min/mg proteínas	0.95 nmol/min/mg proteínas
Bradley y col., 1999	Cama de sedimento de sitios contaminados con gasolina MTBE y TBA fueron mineralizados	30-70 % mineralizado en 105 d	70 % mineralizado en 27 d
Salanitro y col., 1998	Aguas subterráneas contaminadas	ND ^c	Vida media = 16 d
Fayolle y col., 1999	Cultivo puro (<i>Pseudomona sp.</i> IFP 2003) cometabólico	ND ^c	18 mg/g células/h
Zenker y col., 1999	Suelo de sitios contaminados con gasolina	ND ^c	3 mg/L MTBE en 200 d

^a NR = No reportado, ^b Densidad de inoculación no reportada y ^c ND = No degradado

FUENTE: Fayolle F, y col (2000)

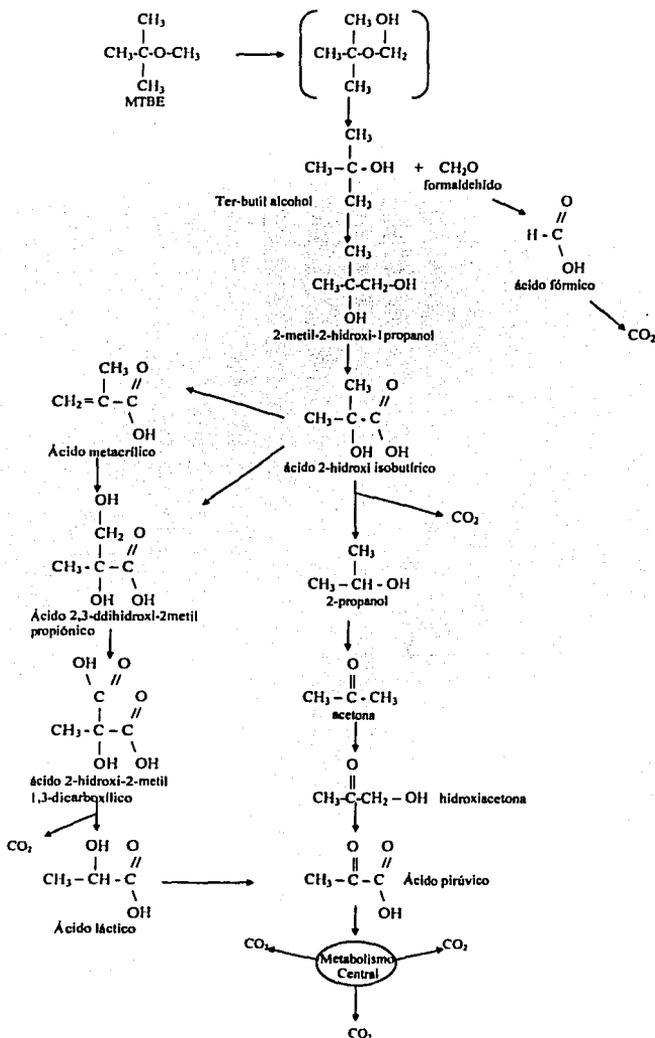


Figura 2.1 Vía de degradación de MTBE por bacterias propanooxidantes (Propuesta por Steffan y col. 1997)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta la fecha, se han conducido muy pocos estudios de manera ordenada para encontrar microorganismos capaces de degradar el MTBE y los cuales puedan utilizarse en tratamientos biológicos.

Las velocidades de degradación del MTBE citadas en la literatura con frecuencia ofrecen dificultades para compararlas entre sí debido a las diferentes metodologías de determinación utilizadas,

En el laboratorio de emisiones gaseosas W-107 de la Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa se cuenta con cuatro consorcios y se propone evaluar su capacidad para degradar al MTBE tomando como referencia a un consorcio de la Universidad de Davis, California, con el fin de poblar un biofiltro.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar cuatro consorcios para evaluar si degradan o no al MTBE como única fuente de carbono y energía en el menor tiempo y en la mayor cantidad posible tomando como referencia al consorcio obtenido de la Universidad de Davis.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener consorcios a partir del material de soporte de biofiltros que utilizan gasolina sintética, para evaluar su capacidad de biodegradación de MTBE como única fuente de energía
- Evaluar la capacidad de biodegradar MTBE por medio de las cinéticas de consumo de los cuatro consorcios (obtenidos en el laboratorio de emisiones gaseosas W-107), comparando sus actividades con la del consorcio de la Universidad de Davis de California.

HIPÓTESIS

Se espera que los consorcios obtenidos a partir de materiales de soporte (composta y vermiculita) de biofiltros que operan con gasolina sintéticas (hexano, tolueno, ciclohexano y MTBE), se puedan obtener consorcios de microorganismos que tengan una alta capacidad de biodegradar el MTBE como única fuente de energía.

TIPO DE ESTUDIO

El tipo de estudio fue experimental

POBLACIÓN

La población de estudio fueron cinco: consorcios, un consorcio de la Universidad de Davis, California, para utilizarse como referencia, otro de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa y tres provenientes de soportes de dos biofiltros (dos de copostas y uno de vermiculita).

CRITERIOS DE:

- **INCLUSIÓN**

Microorganismos que tengan la capacidad de biodegradar el MTBE, pH de 7, temperatura de 30 °C y medio de sales minerales.

- **EXCLUSIÓN**

Aquellos medios enriquecidos, pH mayores o menores de 7 y temperaturas mayores o menores.

- **ELIMINACIÓN**

Aquellos consorcios microbianos que no tengan la capacidad de biodegradar al MTBE.

MATERIAL Y MÉTODOS

- **Microorganismos utilizados**

Se contó con un consorcio bacteriano de la Universidad de Davis, California, para utilizarse como referencia y otro de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

También se contó con tres consorcios provenientes de soportes (dos de composta: parte media y parte superior y uno de vermiculita) de dos biofiltros que utilizaban gasolina sintética, proporcionados por la Planta Piloto (PPU4) del grupo de Tratamientos de Emisiones Gaseosas de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, se intentó separar 3 consorcios de su material de soporte y que estos utilizaran al MTBE como única fuente de energía.

- **Reactivos**

Metil ter-butil éter (98%, $\rho = 0.740 \text{ g/cm}^3$), fueron de Aldrich Chemicals. Sulfato de amonio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$, sulfato de magnesio hepta hidratado $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$, fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) , fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) , cloruro de calcio (CaCl_2) , hidróxido de sodio (NaOH) y ácido clorhídrico (HCl) .

- **Medios de cultivo**

Preparación de medio de sales minerales líquido modificado. (Acuña 1999; Elementos traza modificado de Meynell 1970):

Se pesaron 3 g de sulfato de amonio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$; 1.5 g de sulfato de magnesio hepta hidratado $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ y se disolvieron en 130 mL de agua destilada y se ajustó el pH a 7 con soluciones de NaOH al 0.1 N y/o HCl al 0.1 N, utilizando un potenciómetro previamente calibrado. El fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) 0.6 g; fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) 2.4 g; cloruro de calcio (CaCl_2) 0.15 g se disolvieron en 240 mL de agua destilada y se les adicionaron 5 mL de elementos trazas y se ajustó a pH 7 con soluciones de NaOH al 0.1 N y/o HCl al 0.1 N utilizando un potenciómetro previamente calibrado,

se ajustó el pH a 7 cuanto bastó para un litro de agua destilada con soluciones de NaOH al 0.1 N y/o HCl al 0.1 N utilizando un potenciómetro previamente calibrado.

Se esterilizaron por separado a 121 °C a 15 lb por 15 min. Ya esterilizados las soluciones, se dejaron enfriar a una temperatura de unos 50 °C aproximadamente y se mezclaron.

MEDIO DE	SALES MINERALES	*SOLUCIÓN DE	ELEMENTOS TRAZA
COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (g/L)	COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.0	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.5	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.44
KH ₂ PO ₄	0.6	MgSO ₄ ·H ₂ O	0.8411
K ₂ HPO ₄	2.4	CaCl ₂ ·6H ₂ O	0.2621
CaSO ₄ ó CaCl ₂	0.15	H ₃ BO ₃	0.0620
*Sol. E. Trazas	5 mL	NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.09
pH	6.8-7	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.49

Preparación de medio de sales minerales sólido.

Se pesaron 3 g de sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄); 1.5 g sulfato de magnesio hepta hidratado (MgSO₄·7H₂O) y se disolvieron en 130 mL de agua destilada y se ajustó el pH a 7 con soluciones de NaOH al 0.1 N y/o HCl al 0.1 N utilizando un potenciómetro previamente calibrado. El fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) 0.6 g; fosfato de potasio dibásico (K₂HPO₄) 2.4 g; cloruro de calcio (CaCl₂) 0.15 g se disolvieron en 240 mL de agua destilada y se adicionaron 5 mL de elementos trazas y se ajustó a pH 7 con soluciones de NaOH al 0.1 N y/o HCl al 0.1 N utilizando un potenciómetro previamente calibrado. Se disolvieron 15 g de agar Noble cuanto bastó para un litro de agua destilada, se ajustó el pH a 7 con soluciones de NaOH al 0.1 N y/o HCl al 0.1 N utilizando un potenciómetro previamente calibrado.

Se esterilizaron por separado a 121 °C a 15 lb por 15 min. Ya esterilizadas las soluciones y el agar, se dejaron enfriar a una temperatura de unos 50 °C y se mezclaron los tres y se realizó el vaciado en las cajas Petri en una campana de flujo laminar.

- **Conservación y enriquecimiento de microorganismos**

Para la conservación de los consorcios, se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL con tapón de rosca, se les cambió el medio de sales minerales cada 15 días y se ajustó a pH 7 con soluciones de NaOH 0.1 N y/o HCl 0.1 N utilizando un potenciómetro (Conductronic pH 20) previamente calibrado. Posteriormente se les adicionó 50 μ L MTBE cada semana y antes de cada adición de MTBE se dejaron aireando durante 2 h, con una agitación a 150 rpm y se dejaron durante cinco meses.

De dos biofiltros alimentados con gasolina sintética de la planta piloto del grupo de emisiones gaseosas de la Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa se obtuvieron dos soportes de biofiltros (dos compostas y uno de vermiculita).

Para el enriquecimiento de los consorcios de las dos compostas se pesaron 20 g y se diluyeron en 200 mL de medio de sales minerales (10% p/v) y se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL con tapón de rosca, y se ajustó a pH 7 con soluciones de NaOH al 0.1 N y/o HCl al 0.1 N, utilizando un potenciómetro previamente calibrado y posteriormente se les adicionó 10 μ L MTBE cada semana y antes de cada adición de MTBE se dejaron aireando durante 2 h, con una agitación a 150 rpm y se dejaron durante seis meses.

Para el enriquecimiento de los consorcios de vermiculita se pesaron 5 g y se diluyeron en 100 mL de medio de sales minerales (5 % p/v) en matraces Erlenmeyer de 250 mL con tapón de rosca, y se ajustó a pH 7 con soluciones de NaOH 0.1 N y/o HCl 0.1 N utilizando un potenciómetro previamente calibrado. y posteriormente se les adiciono 4 μ L MTBE cada semana y antes de cada adición de MTBE se dejo aireando durante 2 h, con una agitación a 150 rpm y se dejaron durante seis meses.

Para saber si en los consorcios (compostas y vermiculita) había crecimiento después de los seis, los consorcios en medio de sales minerales líquido, se sembraron en medio de sales minerales (MSM) sólido en cajas Petri a un pH de 7 y se dejaron incubando a 30 °C con una atmósfera de MTBE durante cuatro semanas para su crecimiento y diferenciación .

- **Cuantificación de la biomasa**

Los consorcios obtenidos se centrifugaron a 10,000 rpm/10 min., se eliminó el sobrenadante y se obtuvo la biomasa húmeda (pellets húmedos), posteriormente se pesó una muestra de pellets húmedos de cada consorcio de aproximadamente 50 mg y se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Lowry (Lowry, 1951) a una longitud de onda de 590 nm (λ_{590}), utilizando un Espectrofotómetro (Spectronic 20D) y utilizando celdas de vidrio de 10 mL. Las proteínas son una medida indirecta de la biomasa que se expresan en mg/L. Ver Anexo 1.

- **Estudios en Microcosmos**

Los estudios de descomposición de MTBE se realizaron por el método de microcosmos (Garnier y col. 1999) Los consorcios obtenidos se centrifugaron a 10,000 rpm/10 min., se eliminó el sobrenadante y se obtuvo la biomasa húmeda (pellets húmedos), posteriormente se pesaron para cada microcosmos aproximadamente de 290 a 300 mg pellets húmedos para realizar sus cinéticas de consumo, usando frascos serológicos de 125 mL para cada uno de los consorcios con 20 mL de medio de sales minerales (MSM) líquido para cada frasco y se taparon con los septos y se engargolaron con su crimp.

Cada experimento se hizo por duplicado, las botellas se incubaron a 30 °C con agitación rotatoria (150 rpm). Las mediciones de consumo de oxígeno y formación de dióxido de carbono, así como las de consumo de MTBE se realizaron periódicamente cada 24 horas aproximadamente, por análisis de headspace.

- **Análisis cromatográfico**

Se tomaron muestras de 100 μ L de la fase gaseosa de cada frasco serológico (headspace) con una jeringa para gases (Precisión sampling, Rouger, Louisiana) de 0.5 mL de capacidad y analizadas por cromatografía de gases FID y TDC.

La concentración de MTBE 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 espesor de 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, detector 210 °C y la columna 45 °C.

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, U.S.A.) 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 la columna 30 °C.

Cada medición se hizo por duplicado en el cromatógrafo Hewlett Packard modelo 5890 serie II y las lecturas proporcionadas (área bajo la curva) se convirtió a volumen (μL) de compuesto mediante curvas estándar. Las mediciones en el cromatógrafo de gases GOW-MAC se hicieron una sola vez.

• **Curvas estándar**

Para cuantificar el MTBE, se usaron 10 frascos serológicos con 20 mL de medio de sales minerales (MSM) sin el inoculo. Se les adicionaron cantidades conocidas crecientes (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 μL) de MTBE, y se analizaron por cromatografía de headspace, de la misma forma que los microcosmos. Los datos del área bajo la curva determinados en el cromatógrafo y el volumen del compuesto añadido a cada frasco siguieron una relación lineal por lo que se pudo realizar el ajuste de dicha curva por medio de un análisis de mínimos cuadrados (Dupasquier D. y col. 1999). Las mediciones de los estándares se hicieron cada vez que se midieron los microcosmos, el resultado de la curva estándar fue de $m = 1134.8$, $b = 50.089$ y una $r^2 = 0.9989$.

El volumen del compuesto estudiado se calculó, mediante la transformación de su densidad a masa (mg) y pureza, que es en la forma en la que se reportó en este trabajo.

- **Análisis de regresión de los datos experimentales**

Los datos de las cinéticas de degradación de MTBE se ajustaron mediante el modelo de Gompertz (Acuña y col. 1999).

La velocidad máxima de consumo (V_{MAX}) se calculó a partir de los parámetros del modelo de Gompertz, que se expresaron en este estudio como mg MTBE/mg proteína*h y que estos a su vez se transformaron en nmol MTBE/mg proteína*min. Para que se pudieran comparar con estudios reportados por otros autores. Al realizar el ajuste de los datos experimentales del modelo de Gompertz se utilizó el programa de computo Kaleida Graph versión 3.08 de Synergy Software. Ver anexo 2

Antes de utilizar el modelo de Gompertz para el ajuste de los datos experimentales fue necesario transformarlos para cada punto experimental la cantidad de MTBE consumido.

- **Fórmulas**

- ❖ Fórmulas para la obtención de resultados de respirometría en microcosmos (cromatógrafo GOW MAC)
- Para la obtención del factor de respuesta (es una constante para otros resultados)

$$\text{Factor} = \frac{\text{ABC de O}_2 + \text{ABC N}_2}{\text{ABC Aire}}$$

- Para la obtención del porcentaje de dióxido de carbono (CO_2)

$$\% \text{ de CO}_2 = \frac{70.29 \times \text{ABC de CO}_2 \times \text{Factor}}{\text{ABC N}_2}$$

- Para la obtención del porcentaje de oxígeno (O₂)

$$\% \text{ de O}_2 = \frac{79 \times \text{ABC O}_2}{0.9953 \times \text{ABC N}_2}$$

- Para la obtención de dióxido de carbono (CO₂) formado

$$\text{CO}_2 \text{ formado} = \frac{\% \text{ de CO}_2 \text{ F} \times K}{100} = \text{mmol}$$

- Para la obtención del porcentaje de oxígeno (O₂) consumido

$$\% \text{ de O}_2 \text{ c} = 1 - F$$

- Para la obtención de O₂ consumido

$$\text{O}_{2c} = \frac{\% \text{ de O}_{2c} \times K}{100} = \text{mmol}$$

- Para la obtención de O₂ teórico mineralizado

$$\text{O}_2 \text{ teórico mineralizado} = \frac{\text{MTBE}_F \text{ (mg)} \times 7.5}{88} = \text{mmol}$$

- Para la obtención de O₂ teórico parcialmente mineralizado

$$\text{O}_2 \text{ teórico CH}_2\text{O} = \frac{\text{MTBE}_F \text{ (mg)} \times 1.5}{88} = \text{mmol}$$

- Fórmulas para la obtención de resultados de consumo de MTBE en microcosmos (cromatógrafo Hewlett Packard, modelo 5890 serie II)

- Curva estándar de MTBE para la obtención de μL de MTBE

$$y = mx + b$$

$$x = \mu\text{L de MTBE}$$

$$\mu\text{L de MTBE} = \frac{\text{ABC} - b}{m}$$

- Para la obtención de miligramos de MTBE

$$\text{mg de MTBE} = \mu\text{L de MTBE} \times \rho \text{ MTBE} \times \text{Pureza del MTBE}$$

- Para la obtención del MTBE alimentado

$$\text{MTBE}_A = \text{MTBE}_i \text{ (mg)}$$

- Para la obtención del MTBE consumido

$$\text{MTBE}_c = \text{MTBE}_i \text{ (mg)} - \text{MTBE}_f \text{ (mg)}$$

- Para la obtención del porcentaje del MTBE consumido

$$\% \text{ de MTBE}_c = \frac{\text{MTBE}_c \times 100}{\text{MTBE}}$$

- Curva estándar de Proteínas

$$y = mx + b$$

$$x = \text{mg de proteínas}$$

$$\text{mg de proteínas} = \frac{\text{Abs} - b}{m}$$

- Para la obtención de miligramos de proteína por microcosmos

$$\frac{\text{mg de proteínas}}{\text{microcosmos}} = \frac{\text{mg de proteína problema}}{\text{mg de consorcio problema}} \times \frac{\text{mg de consorcio}}{\text{microcosmos}}$$

- Para la transformación de los datos experimentales para cada punto del modelo de Gompertz

$$\text{Modelo de Gompertz} = \frac{\text{MTBE}_c}{\text{mg proteína}}$$

- Ajustar los datos experimentales para cada punto

$$\text{MTBE}_c = \text{MTBE}_i - \text{MTBE}_p$$

- Para la obtención del gráfico por el modelo de Gompertz

$$Y = \alpha \cdot \exp(-b \cdot \exp^{-kx})$$

➤ Para la obtención de la velocidad máxima (V_{MAX}) siendo la doble derivada del modelo de Gompertz

$$V_{MAX} = \frac{\alpha \cdot k}{e}$$

ABC = área bajo la curva

b = ordenada al origen

m = pendiente

A = alimentado

c = consumido

i = inicial

f = final

p = presente al momento de la medición

K = 3.25 mmol Aire Headspace (constante obtenida de la ley de los gases ideales a una presión de 585 mm Hg, a una temperatura de 25 °C y un volumen de 105 mL)

α = es un parámetro del modelo de Gompertz siendo el valor máximo de la variable dependiente

β = es un parámetro del modelo de Gompertz siendo este cualquier valor agregado de la variable independiente

k = es un parámetro del modelo de Gompertz siendo este la razón de los cambios específicos de la variable dependiente con respecto a la variable independiente.

Abs = Absorbancia

ρ_{MTBE} = 0.74 g/L (densidad del MTBE)

Pureza del MTBE = 99.8 %

Peso molecular del MTBE = 88

Número de carbonos del MTBE = 5

Constante empleada para obtener el porcentaje de dióxido de carbono = 70.29

Constante empleada para obtener el porcentaje de oxígeno = 79 y 0.9953

Constante empleada para obtener el oxígeno teórico mineralizado y parcialmente mineralizado = 7.5 y 1.5

RESULTADOS

En este estudio se utilizaron cuatro consorcios y uno de referencia: dos consorcios provenientes de compostas (parte media y de la parte superior) de un biofiltro y uno de vermiculita (proporcionados por la Planta Piloto (PPU4) del grupo de tratamientos de Emisiones Gaseosas de la UAM – Iztapalapa) y otro consorcio de la UAM – Iztapalapa (proporcionado del Lab. W-107) y el consorcio de referencia de la universidad de Davis, California.

En lo que se refiere a los tres consorcios provenientes de soportes (composta y vermiculita) no hubo crecimiento.

El consorcio de la UAM – Iztapalapa (proporcionado del Lab. W-107) fue identificado como consorcio número 2 y fue evaluado en cuanto a su capacidad de consumir al MTBE como única fuente de carbono y energía, con respecto al consorcio de referencia de la Universidad de Davis, California, fue identificado como consorcio número 1.

En la tabla 9.1 se hace la comparación de resultados entre los consorcios 1 y 2.

En las tablas 9.2 y 9.3 se reportaron los resultados de degradación o consumo de MTBE de los consorcio 1 y 2. En las tablas 9.4 y 9.5 se reportan los resultados de consumo de oxígeno y de la formación de dióxido de carbono (O_2 y CO_2) de los consorcio 1 y 2. *Ver anexo 3*

En la Gráfica 9.1 muestra la cantidad de mg de MTBE/mg de proteínas presente del consorcio 1 cada 24 horas (aproximadamente) y la curva del modelo de Gompertz ajustada (una r^2 de 0.98267) y un consumo de 9.11 mg ó 0.103 mmol que representa el 88.4 % del total de MTBE alimentado y con un peso en mg de proteínas/microcosmos de 1.51 y con una V_{MAX} experimental de 0.031 mg

MTBE/mg de prot.*h ó 5.84 nmol MTBE/mg de prot.*min. y la V_{MAX} teórico es de 0.0705 MTBE/mg de prot.*h ó 13.35 nmol MTBE/mg de prot.*min

En la Gráfica 9.2 muestra la cantidad de mg de MTBE/mg de proteínas presente del consorcio 2 cada 24 horas (aproximadamente) y la curva del modelo de Gompertz ajustada (una r^2 de 0.99426) y un consumo de 10.51 mg ó 0.119 mmol que representa el 99.62 % del total de MTBE alimentado. con un peso en mg de proteínas/microcosmos de 1.33 y con una V_{MAX} experimental de 0.0405 mg MTBE/mg de prot.*h ó 7.65 nmol MTBE/mg de prot.*min. y la V_{MAX} teórico es de 0.0723 mg MTBE/mg de prot.*h ó 13.69 nmol MTBE/mg de prot.*min.

En la Gráficas 9.3 se hace la comparación de mg de MTBE/mg de proteínas presente de los consorcios 1 y 2 y comparados con sus modelos de Gompertz ajustados para cada consorcio.

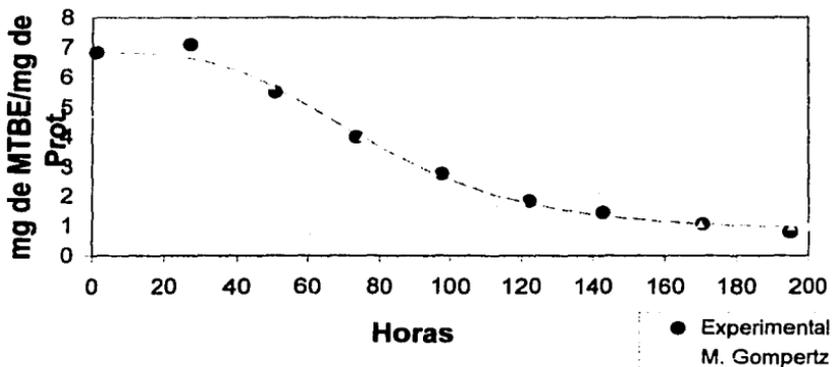
En la Gráfica 9.4 el consorcio 1 muestra el consumo de oxígeno (O_2) de 0.572 mmol (17.6 %) y la formación de dióxido de carbono (CO_2) es de 0.313 mmol (9.63 %) del headspace del microcosmos.

En la Gráfica 9.5 el consorcio 2 muestra el consumo de oxígeno (O_2) de 0.584 mmol (17.98 %) y la formación de dióxido de carbono (CO_2) es de 0.312 mmol (9.60 %) del headspace del microcosmos.

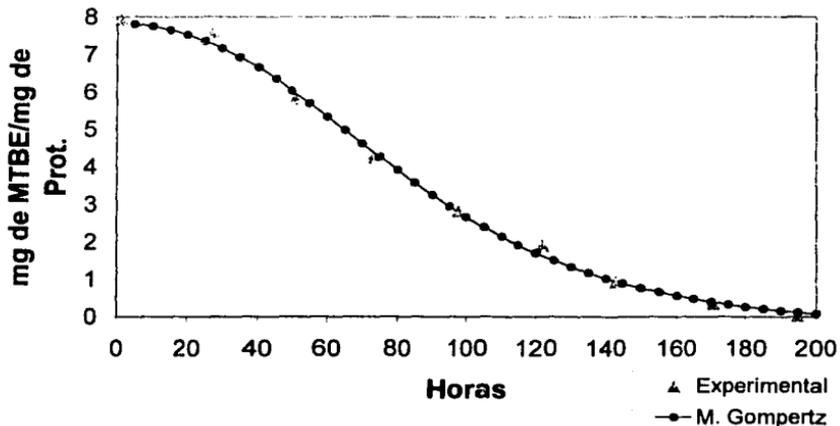
Tabla 9.1 Comparación del resultado del consorcios 2 con el consorcio 1 de referencia

RESULTADOS	CONSORCIO 1	CONSORCIO 2
MTBE inicial	10.31 mg	10.55 mg
MTBE consumido	9.11 mg ó 0.103 mmol	10.51 mg ó 0.119 mmol
% de MTBE consumido:	88.40 % en 194.73 h	99.62 % en 194.95 h
CO ₂ formado:	0.313 mmol	0.312 mmol
% CO ₂ formado:	9.63%	9.60 %
O ₂ consumido:	0.572 mmol	0.584 mmol
%O ₂ consumido:	17.60%	17.98 %
O ₂ teórico parcial (CH ₂ O y TBA):	0.155 mmol	0.179 mmol
O ₂ teórico mineralizado(CO ₂ y H ₂ O):	0.773 mmol	0.893 mmol
Peso de los pellets húmedos en mg (consorcios):	297.5 mg	298.5
mg de proteína/ mg de pellets húmedos:	5.08*10 ⁻³	4.46*10 ⁻³
mg de proteínas / microcosmos	1.51	1.33
V _{max} experimental	0.031 mg MTBE/mg prot.*h	0.0405 mg MTBE/mg prot.*h
V _{max} experimental	5.84 nmol MTBE/ mg prot. * min	7.65 nmol MTBE/ mg prot. * min
Modelo de Gompertz:		
α	5.9649	8.1728
b	8.1966	4.863
k	0.032106	0.024056
r ²	0.98267	0.99426
V _{max} teórica	0.0705 mg MTBE/mg prot.*h	0.0723 mg MTBE/mg prot.*h
V _{max} teórica	13.35 nmol MTBE/ mg prot. * min.	13.69 nmol MTBE/ mg prot. * min.

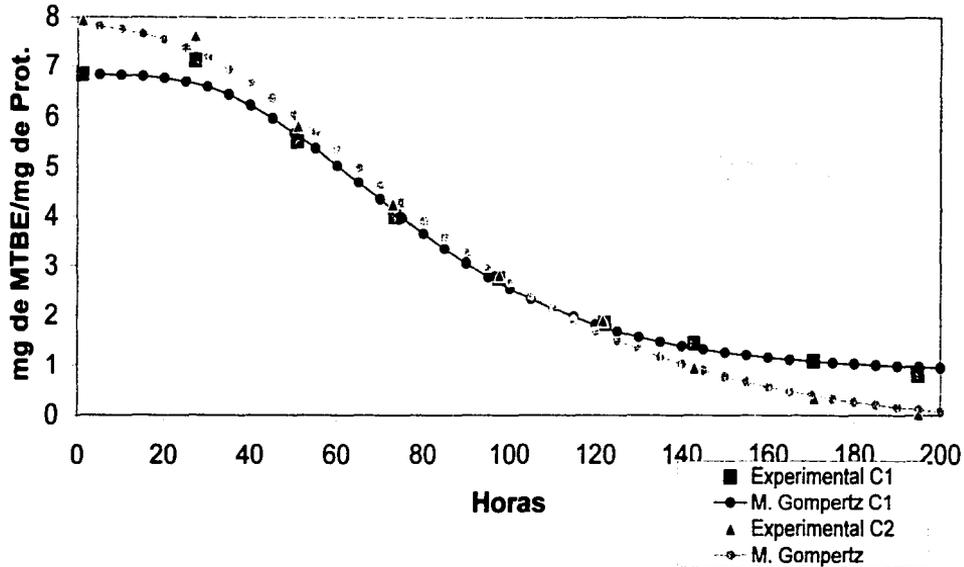
Gráfica 9.1 MTBE presente/mg de proteínas del consorcio 1



Gráfica 9.2 MTBE presente/mg de proteína del consorcio 2

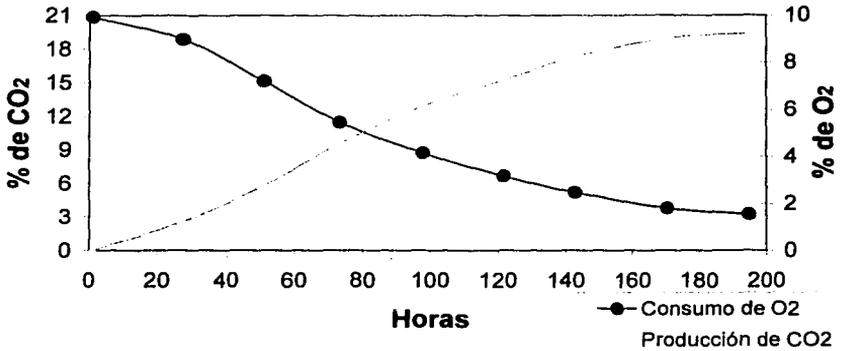


Gráfica 9.3 MTBE presente/mg de proteína de los consorcio 1 y 2

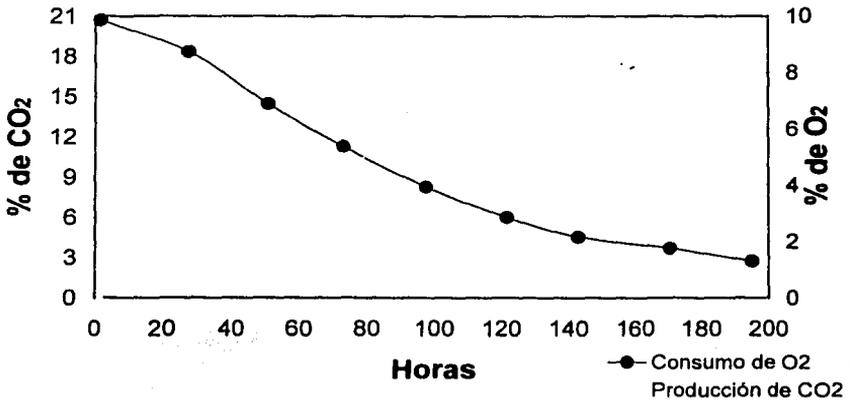


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 9.4 Consumo de O₂ y formación de CO₂ del consorcio 1



Gráfica 9.5 Consumo de O₂ y formación de CO₂ del consorcio 2



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

Como se mencionó en los resultados los tres consorcios provenientes de soportes (composta y vermiculita) de biofiltros que estuvieron inicialmente en cultivos (líquidos) de crecimiento en matraces Erlenmeyer con tapón de rosca en medio de sales minerales fueron sembrados en medio de agar noble sólido bajo una atmósfera de MTBE, sin embargo no se obtuvo crecimiento de microorganismos.

La falta de crecimiento de los consorcios provenientes de los soportes pudo deberse a que los microorganismos existentes estaban adaptados a una gasolina sintética, dicha gasolina tiene una menor cantidad de MTBE que la cantidad empleada en el crecimiento de los consorcios, los microorganismos no fueron capaces de asimilar al MTBE como única fuente de carbono y energía. Se considera que estos microorganismos presentes en los soportes hayan estado consumiendo MTBE por la vía cometabólica y por ello no hubo crecimiento en medio de sales minerales tanto sólido como líquido.

En las gráficas 9.4 y 9.5 se hizo una comparación del consumo de oxígeno (O_2) y de la formación de dióxido de carbono (CO_2) de los consorcios 1 y 2 y no se observa gran diferencia entre ellos ya que casi consumieron la misma cantidad de O_2 , para el consorcio 1 fue de 0.572 mmol (17.6 %) del headspace y para el consorcio 2 de 0.584 mmol (17.98 %) del headspace; la formación de CO_2 del consorcio 1 fue de 0.313 mmol (9.63 %) del headspace y del consorcio 2 de 0.312 mmol (9.60 %) del headspace.

En el consorcio 1 el consumo de O_2 fue de 0.572 mmol siendo estequiométricamente 3.7 veces mayor que el consumo de O_2 teórico a formaldehído y ter-butyl alcohol (CH_2O y TBA) 0.155 mmol pero estequiométricamente fue 0.26 veces menor que el teórico mineralizado a dióxido

de carbono y agua (CO_2 y H_2O) 0.773 mmol, y el consorcio 2 fue de 0.584 mmol siendo estequiométricamente 3.26 veces mayor que el consumo de O_2 teórico CH_2O y TBA 0.179 mmol pero estequiométricamente fue 0.35 veces menor que el teórico mineralizado a CO_2 y H_2O 0.893 mmol. Como se suspendieron las mediciones de MTBE en el cromatógrafo Hewlett Packard el cual podía también haber detectado los otros compuestos orgánicos volátiles como alcohol terbutílico, acetona y 2-propanol; además al mismo tiempo se suspendieron las mediciones de CO_2 y O_2 al mismo tiempo, no es posible saber hasta que grado se llevo la degradación del MTBE.

Los resultados obtenidos de la degradación de MTBE por los consorcios 1 y 2 ya existentes se modelaron mediante una función de regresión no lineal propuesta por B. Gompertz la cual ha sido utilizada para modelar el crecimiento de bacterias entre otros microorganismos.

Después de aplicar el análisis del modelo de Gompertz se obtuvieron los siguientes coeficientes con los que se calculó la velocidad máxima (V_{MAX}) teórica de degradación del MTBE siendo mayor la del consorcio 2 y estas a su vez se compararon con las experimentales siendo más bajas que las teóricas como se muestra en la siguiente tabla 10.1.

Tabla 10.1 Comparación de los resultados teóricos con los experimentales.

Coefficientes y Resultados	Consorcio 1	Consorcio 2
α	5.9649	8.1728
b	8.1966	4.863
k	0.032106	0.024056
r^2	0.98267	0.99426
V_{MAX} Teórica (mg MTBE/mg prot*h)	0.0705	0.0723
V_{MAX} Teórica (nmol MTBE/mg prot*min.)	13.35	13.69
V_{MAX} Experimental (mg MTBE/mg prot*h)	0.031	0.0405
V_{MAX} Experimental (nmol MTBE/mg prot*min.)	5.84	7.65

El consorcio 2 fue capaz de degradar un 23.66 % más rápido al MTBE en comparación con el consorcio 1.

En lo que se refiere a la comparación del consorcio 2 con otros estudios ya existentes esta se ve dificultada debido a la diferencia de unidades (en su mayoría biomasa) empleadas por otros autores. Sin embargo, de acuerdo a lo reportado en la tabla 2.1 por Salanitro y col., Deeb y col. (2000), Steffan, col. (2000b) son mayores a las reportadas en este estudio. En la comparación del consorcio 2 con lo reportado en la tabla 2.2 no entra en el rango de la velocidad de degradación reportado por Hymay y col. (1998), sin embargo en los estudios reportados por Steffan y col.(1997) y Garnier y col. (1999) la velocidad de degradación del MTBE obtenida entra en los rango reportados, están por arriba del límite inferior.

Como se observa en los resultados el consorcio 1 y el consorcio 2 presentan similitud en las V_{MAX} de degradación, en el consumo de O_2 , formación de CO_2 , en la mineralización parcial (CH_2O y TBA) y en la mineralización total (CO_2 y H_2O).

No se logró desarrollar una comparación con otros estudios debido a la diferencia de unidades sobretodo en biomasa entre este experimento y otros.

CONCLUSIONES

- A partir de los materiales de soporte (compostas y vermiculita) provenientes de biofiltros con gasolina sintética, no se obtuvieron consorcios microbianos que utilizaran como única fuente de carbono y energía al MTBE por lo que no se evaluó su capacidad de biodegradación.
- Se demostró la biodegradación del MTBE por los consorcios 1 y 2 que utilizaron este compuesto como única fuente de carbono y energía bajo condiciones aeróbicas.
- En cuanto a la capacidad del consorcio 2 de degradar al MTBE se observó que este tuvo una velocidad máxima de degradación ligeramente mayor que la del consorcio 1 utilizado como referencia.
- El consorcio 2 e incluso el consorcio 1 cumplen con las características para poder plantear estrategias de biorremediación en biorreactores.

ANEXOS

Determinación de proteínas por Lowry

Reactivos:

Solución patrón de albúmina bovina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Reactivo A : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1 % en H_2O

Reactivo B: tartrato doble de Na y K al 2 %

Reactivo C: Na_2CO_3 al 2 % en NaOH al 0.1 N

Reactivo D: A + B preparar cuando se va a utilizar

Reactivo E: 1D + 50C preparar cuando se va a utilizar

Reactivo de Folin 1:1 con H_2O preparar cuando se va a utilizar

Preparación de la muestra problema:

Se tomó 1 mL de la muestra se aforó a 10 mL, se tomó 0.5 mL de la solución problema y se adicionó 0.5 mL de NaOH al 2 N y se colocó en baño María por 5 minutos.

Procedimiento:

1. Tomar una alícuota de 1 mL de la muestra problema, colocarla en un tubo de ensaye
2. Agregar 5 mL de reactivo E, agitar vigorosamente y reposar 10 minutos
3. Agregar 0.5 mL del reactivo de Folin (1:1 con H_2O) agitar vigorosamente
4. Reposar 30 minutos
5. Leer a 590 nm

Curva estándar de proteínas:

Solución patrón de albúmina bovina 25 mg de albúmina bovina, aforar a 50 mL NaOH.

Vol. de la sol. Patrón (μL)	μL de H ₂ O	Vol. total mL	Concentración mg/L	Absorbancias
0	500	1	0 (blanco)	0
100	400	1	50	0.115
200	300	1	100	0.230
300	200	1	150	0.325
400	100	1	200	0.426
500	0	1	250	0.499
Problema	Consorcio 1		49 mg Dil. 1:10	0.064
Problema	Consorcio 2		52 mg Dil. 1:10	0.0606

Biomasa de consorcios por microcosmos

Consorcio 1

49 mg de pellets húmedos y centrifugados equivalentes a 0.249 mg de proteína.

$$\frac{0.249 \text{ mg de proteínas}}{49 \text{ mg de pellets prob.}} \times \frac{297.5 \text{ mg de pellets del consorcio}}{\text{microcosmos}} = \frac{1.51 \text{ mg de proteína}}{\text{microcosmos}}$$

Consorcio 2.

52 mg de pellets húmedos y centrifugados equivalente a 0.249 mg de proteína.

$$\frac{0.232 \text{ mg de proteínas}}{52 \text{ mg de pellets prob.}} \times \frac{298.5 \text{ mg de pellets del consorcio}}{\text{microcosmos}} = \frac{1.33 \text{ mg de proteína}}{\text{microcosmos}}$$

MODELO DE GOMPERTZ

El modelo de Gompertz es una función asintótica la cual ha sido utilizada para modelar el crecimiento tanto de plantas como de bacterias esta función tiene tres parámetros arreglados como una doble exponencial :

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

donde Y = a la variable aleatoria a estimar ; α es la máxima cantidad de Y (tendrá las mismas unidades que Y) y k es la razón de cambio específico de la variable dependiente con respecto a la variable independiente (se expresa en unidades de X^{-1}), β es un valor agregado de X y X es la variable independiente.

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

En este trabajo, el modelo de Gompertz quedará de la siguiente forma.

$$Sc = \alpha \exp(\beta \exp^{-kx})$$

donde $Sc = S_0 - S$, siendo el sustrato consumido (mg) en el tiempo (h), α es la máxima cantidad de sustrato consumido (mg de sustrato/unidad experimental y k es la velocidad específica de consumo de sustrato (h^{-1}). Las unidades de la velocidad de consumo se expresan como mg de sustrato consumido/hora/mg de proteína.

Tabla 9.2 Resultados de degradación de MTBE del consorcio 1

Consortios	Tiempo de cultivo (h)	Tiempo promedio de cultivo (h)	ABC	Microlitros de MTBE alimentado	mg de MTBE Presente	Promedio de MTBE presente	Consumo de MTBE	Promedio de MTBE consumido	Promedio de MTBE pres. en mg /mg de Proteínas	Promedio de MTBE consum. en mg /mg de Proteínas
1' y 1"	1	1.04	16266	14.29	10.55	10.73	-0.24	-0.42	6.83	0.00
			16813	14.77	10.91		-0.60			
1"	1.08		15203	13.35	9.86	9.89	0.45	0.42		
			15296	13.43	9.92		0.39			
1'	27.03	27.09	16181	14.21	10.50	10.57	-0.19	-0.25	7.10	0.27
			16389	14.40	10.63		-0.32			
1"	27.15		16715	14.69	10.85	10.88	-0.53	-0.57		
			16814	14.77	10.91		-0.60			
1'	50.77	50.81	13044	11.45	8.46	8.48	1.86	1.83	5.49	1.33
			13131	11.53	8.51		1.80			
1"	50.85		12428	10.91	8.06	8.11	2.26	2.20		
			12591	11.05	8.16		2.15			
1'	72.85	72.89	9090	7.97	5.88	5.94	4.43	4.37	3.99	2.84
			9280	8.13	6.01		4.30			
1"	72.93		9420	8.26	6.10	6.11	4.21	4.21		
			9443	8.28	6.11		4.20			
1'	97.47	97.52	6350	5.55	4.10	4.10	6.21	6.21	2.75	4.08
			6354	5.56	4.10		6.21			
1"	97.57		6473	5.66	4.18	4.20	6.13	6.11		
			6542	5.72	4.22		6.09			
1'	122.6	122.15	4265	3.71	2.74	2.75	7.57	7.56	1.85	4.98
			4287	3.73	2.76		7.55			
1"	121.7		4335	3.78	2.79	2.82	7.52	7.49		
			4444	3.87	2.86		7.45			
1'	142.77	142.81	4004	3.48	2.57	2.58	7.74	7.74	1.44	5.39
			4013	3.49	2.58		7.73			
1"	142.85		2732	2.36	1.75	1.77	8.57	8.54		
			2808	2.43	1.79		8.52			
1'	170.5	170.55	3541	3.08	2.27	2.28	8.04	8.03	1.07	5.76
			3566	3.10	2.29		8.02			
1"	170.6		1508	1.28	0.95	0.96	9.36	9.35		
			1545	1.32	0.97		9.34			
1'	194.68	194.73	2856	2.47	1.83	1.86	8.49	8.45	0.80	6.76
			2957	2.56	1.89		8.42			
1"	194.78		839	0.70	0.51	0.55	9.80	9.76		
			942	0.79	0.58		9.73			

ABC. Area Bajo la Curva

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Tabla 9.3 Resultados de degradación de MTBE del consorcio 2

Conorcios	Tiempo de cultivo (h)	Tiempo de promedio de cultivo (h)	ABC	Microlitros de MTBE alimentado	mg de MTBE Presente	Promedio de MTBE presente	Consumo de MTBE	Promedio de MTBE consumido	Promedio de MTBE pres. en mg /mg de	Promedio de MTBE consum. en mg /mg de
2' y 2"	1.13	1.16	16008	14.06	10.39	10.61	0.16	-0.06	7.93	0.00
2'			16698	14.67	10.83		-0.28			
2"	1.18		16005	14.06	10.38	10.49	0.17	0.06		
			16334	14.35	10.60		-0.05			
2'	27.18	27.21	15477	13.59	10.04	10.08	0.51	0.47	7.60	0.33
			15609	13.71	10.13		0.42			
2"	27.23		15587	13.69	10.11	10.13	0.44	0.42		
			15653	13.75	10.15		0.40			
2'	50.9	50.92	11616	10.19	7.53	7.58	3.02	2.97	5.81	2.12
			11776	10.33	7.63		2.92			
2"	50.93		12145	10.66	7.87	7.88	2.68	2.67		
			12174	10.68	7.89		2.66			
2'	72.97	73.00	8143	7.13	5.27	5.29	5.28	5.26	4.22	3.71
			8202	7.18	5.31		5.24			
2"	73.02		9133	8.00	5.91	5.95	4.64	4.60		
			9256	8.11	5.99		4.56			
2'	97.6	97.63	5330	4.65	3.44	3.45	7.11	7.10	2.82	5.12
			5378	4.70	3.47		7.08			
2"	97.65		6257	5.47	4.04	4.04	6.51	6.51		
			6262	5.47	4.04		6.51			
2'	121.73	121.76	3628	3.15	2.33	2.35	8.22	8.20	1.91	6.03
			3683	3.20	2.36		8.19			
2"	121.78		4220	3.67	2.71	2.72	7.84	7.83		
			4250	3.70	2.73		7.82			
2'	142.9	142.93	1761	1.51	1.11	1.12	9.44	9.43	0.94	7.00
			1789	1.53	1.13		9.42			
2"	142.95		2139	1.84	1.36	1.36	9.19	9.19		
			2156	1.86	1.37		9.18			
2'	170.65	170.68	530	0.42	0.31	0.32	10.24	10.23	0.34	7.59
			542	0.43	0.32		10.23			
2"	170.7		946	0.79	0.58	0.58	9.97	9.97		
			945	0.79	0.58		9.97			
2'	194.92	194.95	61	0.01	0.01	0.01	10.54	10.54	0.03	7.90
			55	0.00	0.00		10.55			
2"	194.97		147	0.09	0.06	0.07	10.49	10.48		
			170	0.11	0.08		10.47			

Tabla 9. 4 Resultados de consumo de O₂ y formación de CO₂ del consorcio 1

	Tiempo de cultivo (h)	Tiempo promedio de cultivo (h)	ABC Aire	ABC CO ₂	ABC O ₂	ABC N ₂	Factor	%CO ₂	Promedio %CO ₂	%O ₂	Promedio %O ₂
1'	0.98	1.025	57816	0	38694	146220	3.2	0	0	21	20.85
1"	1.07		62315	0	38706	148420	3	0		20.7	
1'	27	27.065	90155	1334	32036	135400	1.86	1.29	1.22	18.78	18.875
1"	27.13		60336	799	36477	152640	3.13	1.15		18.97	
1'	50.75	50.79	59733	2012	31987	170380	3.39	2.81	2.74	14.9	15.12
1"	50.83		75526	2406	30670	158680	2.51	2.67		15.34	
1'	72.82	72.86	54643	3191	24033	172600	3.6	4.68	4.55	11.05	11.455
1"	72.9		71611	3919	22786	152550	2.45	4.42		11.86	
1'	97.45	97.49	61554	4894	18115	166480	3	6.2	6.15	8.64	8.715
1"	97.53		84278	6586	14911	134570	1.77	6.1		8.79	
1'	121.57	121.6	77245	7407	13859	167900	2.35	7.3	7.27	6.55	6.66
1"	121.63		71860	6841	14587	171010	2.58	7.25		6.77	
1'	142.75	142.79	59399	6447	11599	180550	3.23	8.12	8.26	5.1	5.185
1"	142.83		75976	8516	11111	167460	2.35	8.4		5.27	
1'	170.48	170.53	63473	7533	9376	187670	3.1	8.76	9.025	3.97	3.775
1"	170.58		86216	10904	8241	182820	2.22	9.29		3.58	
1'	194.67	194.71	59217	7109	7854	163370	2.8	8.84	9.24	3.82	3.255
1"	194.75		54861	7270	5844	172430	3.25	9.63		2.69	

ABC, Área Bajo la Curva

Tabla 9.5 Resultados de consumo de O₂ y formación de CO₂ del consorcio 2

Consortio	Tiempo de	Tiempo	ABC	ABC	ABC	ABC	Factor	%CO ₂	Promedio	%O ₂	Promedio
	cultivo (h)	promedio									
2'	1.13	1.155	55302		39752	152540	3.48	0	0	20.68	20.72
2'	1.18		52817		40825	156070	3.73	0		20.76	
2'	27.18	27.205	80029	1413	30732	136210	2.09	1.52	1.425	17.91	18.36
2'	27.23		57965	887	36488	153950	3.29	1.33		18.81	
2'	50.9	50.915	85039	3297	26009	148150	2.05	3.2	3.025	13.93	14.465
2'	50.93		62238	2122	30514	161450	3.08	2.85		15	
2'	72.97	72.995	64751	3880	22240	159910	2.81	4.8	4.58	11.04	11.275
2'	73.02		62427	3384	22832	157500	2.89	4.36		11.51	
2'	97.6	97.625	55300	4565	17731	169340	3.38	6.41	6.19	8.31	8.285
2'	97.65		68492	5269	16475	158400	2.55	5.97		8.26	
2'	121.73	121.755	63014	5980	13172	182790	3.11	7.15	7.005	5.72	6.015
2'	121.78		63989	5785	14115	177680	3	6.86		6.31	
2'	142.9	142.925	63152	7094	10011	178280	2.98	8.34	8.2	4.46	4.55
2'	142.95		64537	6992	10217	174920	2.87	8.06		4.64	
2'	170.65	170.675	66294	8419	9866	193590	3.07	9.38	9.285	4.05	3.71
2'	170.7		90484	11354	7046	166090	1.91	9.19		3.37	
2'	194.92	194.945	64825	8612	5825	161580	2.58	9.67	9.595	2.86	2.745
2'	194.97		64015	8392	5491	165880	2.68	9.52		2.63	

ABC, Área Bajo la Curva

BIBLIOGRAFÍA

1. EPA (1994-a) Chemicals in the Enviroment: Methyl-tert-Butyl Ether
Office of Pollution Prevention and Toxics.
U.S. Enviromental Protection Agency.
EPA 749-F-94-017a
http://www.epa.gov/pootintr/chemfact/s_mtbe.txt
2. Western States Petroleum Association (WSPA, 1998) MTBE: The Basics.
<http://www.wspaa.org/media/mtbepub1.html>
3. Steffan J, Mc Clay K, Vainberg S, Condee W, Zhang D. Biodegradation of gasoline oxygenates Methyl t-butyl ether and tert-Amil Methyl ether by propan-oxidizing bacteria. Appl Environ Microbiol 1997; 63: 4216-22
4. EPA (2000) Methyl-tert-Butyl Ether (MTBE). MTBE in fuels
Enviromental Protection Agency.
<http://www.epa.gov/mtbe/gas.htm>
5. EPA (1994-b) Chemical summary for Methyl-tert-Butyl Ether
Office of Pollution Prevention and Toxics.
U.S. Enviromental Protection Agency.
EPA 749-F-94-017a
http://www.epa.gov/pootintr/chemfact/s_mtbe.txt
6. Shields D. MTBE: Ningún riesgo para la salud, asegura PEMEX. Sección de Negocios, Periódico El Financiero 2000; Enero 12 p 20
7. Crilde C. S. The Kinetics of Cometabolism. Biotechnol Bioehg. 1993; 41:1048 1056
8. EPA (1998) Oxigenates in Water: Critical information and research need.
Office of Research and Development.
U, S, Enviromental Protection Agency
EPA/600/R-98/048
<http://www.epa.gov/cgi-bin/clarigw>
9. Dean J. A. 1989; Lange Manual de Química Tomo III. McGraw Hill. México. 1ª Edición en Español
10. Grady C. Biodegradation of toxic organics: status and potential. J Environ Eng 1990; 116: 805-828

11. 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.
12. Mehlman M. A. Pollution by gasoline containing hazardous Methyl tertiary-butyl ether. Archives of Environmental Health. 1998; 53: 245
13. Celestinos A. Influencia de la Tecnología en el Medio Ambiente. Rev Soc Quim Méx 1995; 39: 51-65
14. Church C, Tratnyek P, Pankow J, Landmeyer J, Baehr A, Thomas M, Schirmer M. Effects of Environmental conditions on MTBE degradation in model column aquifers. Proceedings of the technical Meeting U.S. Geological Survey Toxic Substances. Charleston, SC, 1999 March 7-12.
15. Hardison L, Curry S, Cuiffetti L, Hyman M. Metabolism of diethyl ether and cometabolism of Methyl tert-Butyl Ether by a filamentous fungus, a *Graphium* sp. Appl Environ Microbiol 1997; 63: 3059-67
16. Acuña E, Pérez F, Auria R, Revah S. Microbiological and Kinetic Aspects of a Biofilter for the Removal of Toluene from waste Gases. Biotechnol Bioeng 1999; 63: 175-183
17. Grady L. Biodegradation: its measurement and microbiological basis. Biotechnology and bioengineering 1985; 27:660-74
18. Fortin Y, Morales M, Nakagawa Y, Focht D, Deshusses M. Methyl tert-butyl ether (MTBE) degradation by a microbial consortium. Environ Microbiol 2001; 3: 1-11
19. Mo K, Lora C, Waken A, Kulpa C. Biodegradation of MTBE and other oxygenates. American Society for Microbiology Meeting, Washington, D.C. (1995) <http://www.nd.edu/cbpc/kulpa3.html>.
20. Morales M, Deshusses M, Revah S. 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. 2000 Paper 795
21. Horvat S. Microbial Co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature. Bacteriol rev 1972; 36: 146-155
22. Fayolle F, Vandecasteele P, Monot F. Microbial degradation and fate in the environment of methyl tert-butyl ether and related fuel oxygenates. Appl Microbiol Biotechnol 2001; 56: 339-349

23. Dalton H, Stirling I. Co-metabolism. *Phil Trans R Soc Lond* 1982; 297: 481-496.
24. Mo K, Lora C, Waken A, Javanmardian M, Yang X, and Kulpa F, Biodegradation of gasoline oxygenates, MYBE by mixed and pure culture. American Society for Microbiology Meeting, New Orleans, L, A , (1996) <http://www.nd.edu/cbpc/kulpa3.htm>
25. Horan M, Brown J. Biodegradation and inhibitory effects of Methyl t-butyl ether (MTBE) added to microbial consortia. Proceeding of the 10th Annual conference on Hazardous Waste Research.;1995 <http://www.engg.ksu.edu/HSRC/95proceed/horan.html>
26. Deeb A, Scow M, Alvarez C. Aerobic MTBE biodegradation: and examination of past studies, current challenges and future research directions. *Biodegradation* 2000; 11: 171-186
27. Stocking J, Deeb A, Flores E, Stringfellow W, Talley J, Brownell R, Kavanaugh C. Bioremediation of MTBE: a review from a practical perspective. *Biodegradation* 2000; 11: 187-201
28. Mo K, Lora C, Waken A, Javanmardian M, Yang X, and Kulpa F, Biodegradation of methyl t-butyl ether by pure bacterial culture. *Appl. Microbiol Biotechnol* 1997; 47:69-72
29. Eweis J, Chang D, and Schroeder E, Meeting the Challenge of MTBE Biodegradation. For presentation at the air and waste management Association's 90th Annual Meeting and Exhibition. June 1997;8-13, Toronto, Ontario, Canada.
30. Eweis J, Schroeder E, Chang D, Scow K. 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
31. Fortin Y, Deshusses M. Treatment of Methyl tert-Butyl Ether vapors in biotrickling filters. 1 . Reactor startup, Steady-state performance, and culture characteristics. *Environ Sci Technol* 1999; 33: 2980-2986
32. Fortin Y, Deshusses M. Treatment of Methyl tert-Butyl Ether vapors in biotrickling filters. 2 . Reactor startup, Analysis of rate-limiting step and behavior under transient conditions. *Environ Sci Technol* 1999; 33: 2987-2991
33. Hanson R, Ackerman E, Scow M. Biodegradation of methyl t-butyl ether by a bacterial pure culture. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 4788-92

34. Acuna-Askar, Englande J, Hu C, Jin G. Methyl tertiary-butyl ether (MTBE) Biodegradation in Batch and Continuous Upflow Fixed-Biofilm Reactors. Proceedings of the International Association on Water Quality (IAWQ). Mérida Yucatan, México. 1999 nov. 14-18
35. Deeb R, Hu C, Hanson J, Scow K, Alvarez L. Substrate interactions in BTEX and MTBE mixtures by an MTBE-degrading isolate. Environ. Sci. Technol. 2001; 35:312-317
36. Fortin Y, Morales M, Nakagawa D, Focht D, Deshusses A. Methyl tert-butyl ether (MTBE) degradation by a microbial consortium. Environ Microbiol 2001; 3: 1-11
37. Steffan J, Clay K, Vainberg S, Condee W, Zhang d. Biodegradation of the gasoline oxigenates methyl tert-butyl ether. Etyl tert-butyl ether and tert-amil methyl ether by propane-oxidizing bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 1997; 63: 4216-4222