



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

BIODEGRADACION DE ETHERS USADOS COMO ADITIVOS
OXIGENADOS DE LA GASOLINA POR COMETABOLISMO
CON C3-C7 n-ALCANOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

MARIA LAURA GONZALEZ RESENDIZ



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARCIA GUADALUPE MORALES IBARRIA

2005

m342119



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

Biodegradación de éteres usados como aditivos oxigenados de
la gasolina por cometabolismo con C3-C7 n-alcenos
realizado por

María Laura González Resendiz

con número de cuenta 91311801 , quien cubrió los créditos de la carrera de:
Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario Dra. Marcia Guadalupe Morales Ibarria

Propietario Dra. Hilda Patricia León Tejera

Propietario M. en C. Marcela Ruedas Medina

Suplente Biol. María del Jazmín Aguilar Medina

Suplente M. en B. Elia Velázquez Mejía

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGIA

Agradecimientos

La parte experimental de esta tesis se hizo en los laboratorios del Programa de Investigación de Biotecnología en el Instituto Mexicano del Petróleo.

Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Marcia Guadalupe Morales Ibarria, gracias al financiamiento otorgado por el Proyecto D.00888, Investigación para el desarrollo de combustibles con calidad ambiental desarrollado en el Programa de Medio Ambiente y Seguridad (PIMAS) dentro del Programa de Becas del Plan para la Formación y Desarrollo del Factor Humano del Instituto Mexicano del Petróleo.

Al proyecto FIES-01-03-VI
"Biodegradación de aditivos oxigenados
de la gasolina"

Dedico esta tesis con mucho cariño a mis padres sin ellos este trabajo no sería posible, a papá por el impulso y el apoyo, a mamá por el amor y el ejemplo, madre eres el ser más importante de mi vida.

A la de sonrisa fácil y nervios de gelatina, a la de carácter fuerte y corazón de pollo, al de nobleza extrema y alma sensible, al de las bromas incansables y picardía de galán. Araceli, Patricia, Felipe y Héctor mis compañeros de aventura en esta vida por quienes siento un enorme amor, respeto y admiración.

A la Dra. Marcia Morales por su profesionalismo, dedicación, asesoría y paciencia. La experiencia que me deja es invaluable mejor profesora no puede tener un estudiante.

A la Dra. Hilda León por su apoyo.

A la M. en C. Marcela Ruedas, a la M. en B. Elia Velázquez, a la cuasi M. en B. Jazmín Aguilar a todas ellas gracias por sus comentarios y su amistad ambos muy valiosos para mí.

A Carlos Castillo excelente profesor y amigo.

A mis pingos adorados Rodolfo, Gabriel, Alfonso, Karla, Felipe, y Gustavo.

A Rodolfo y Eduardo por querer a las panteras.

A mis abuelas Antonia y Aurelia, al recuerdo de mis abuelos Felipe y Baldomero.

A Isabel Chávez y Anselmo Resendiz por la distinción del nombre.

A Erika Romero, Jorge Castañeda, Martín Andrés, Lidia Adrián y Ricardo Villalobos hermanos por decisión.

A Ileana Alcocer, Luis Felipe Vilchis, Carlos Oronoz, Belinda Victoria, Einar Adame y José Luis Munguía por la amistad sincera.

A los que por casi un año compartieron la defensa de ideas consideradas aún hoy fundamentales para nuestra universidad: Higinio Muñoz, José Sarabia, José Blancas, Rodolfo Zamudio, Ariadna Álvarez, Álvaro Ross, Javier Villegas, Argelia Pérez, Huguito Sánchez, el Chaparrito Aldo, Jaime y Hugo Espinal. A los que ahora comparten estas ideas y refrescan el espacio Citalli, Martha, Isabel, José terrestre y los que vendrán.

A los nuevos amigos Rosa Salázar, César Elizalde, Miguel Huicochea, Alejandro Mejía.

A los compañeros y amigos que estuvieron conmigo a lo largo de estos años: Blas, Rigo, Fernando, Laurita Padilla, Antonio González, Popoca, Enrique, Daniel.

A Hilario Islas y Nidia Alarcón por su cariño.

A la nueva familia, Juanita Mérida, Luis Ángel Martínez Pérez y Luis Ángel Martínez, con cariño.

A Jorge Luis Martínez Mérida por ser parte importante de este trabajo aún cuando solo era un proyecto, por todo el amor que día a día me brindó, y por la aventura que estamos por iniciar juntos.

A Patricia y Eva donde quiera que estén.

Y a todos aquellos que de una u otra manera forman y formaran parte de mi vida.

Resumen

La incorporación de aditivos oxigenados como el Metil ter-Butil Éter (MTBE), el Etil ter-Butil Éter (ETBE) y el ter-Amil Metil Éter (TAME), como parte del Programa de Reformulación de la Gasolina (RFG), buscó una solución parcial al problema de contaminación por plomo y al mismo tiempo mejorar la combustión de la gasolina. El MTBE es uno de los oxigenantes más utilizados en la gasolina, para hacer más eficiente la combustión de la misma en los vehículos automotores, sin embargo, se ha comprobado que el uso extensivo del MTBE ha propiciado la contaminación de mantos acuíferos, debido a la evaporación de la gasolina en estaciones de servicio, a derrames accidentales y fugas de tanques de almacenamiento, que provocan la fuga del MTBE hacia los cuerpos de agua subterránea. Dado que el MTBE es altamente soluble en agua, y que ha sido clasificado como potencialmente cancerígeno para los humanos, se hace necesario removerlo. En la actualidad existen diversos tratamientos para ello y la aplicación de estos dependerá de las concentraciones de MTBE y del sitio contaminado. La biorremediación, como una opción de eliminación, ha demostrado ser efectiva para eliminar compuestos de difícil degradación y en muchos casos el cometabolismo ha demostrado ser una alternativa viable. La búsqueda y caracterización de poblaciones microbianas capaces de degradar este tipo de compuestos constituye la base del éxito de cualquier alternativa biológica de tratamiento. De esta manera, este estudio pretende contribuir al conocimiento que se tiene sobre degradación cometabólica del MTBE y de otros oxigenados de la gasolina utilizando diferentes alcanos lineales de cadena corta, mediante la caracterización de un consorcio microbiano obtenido de sitios contaminados con gasolina de la región sureste de México.

El consorcio obtenido y denominado MI-P estuvo compuesto por tres cepas del género *Pseudomonas* aislado de suelos contaminados con gasolina y fue capaz de mineralizar por cometabolismo el Metil ter-butil éter (MTBE), ter-Amil metil éter (TAME), ter-Butil alcohol (TBA), ter-Amil alcohol (TAA), Etil ter-butil éter (ETBE) y Di-isopropil éter (DIPE), cuando se utilizaron n-alcanos de cadena corta en un rango de C3-C7 como fuente de carbono y energía. La mineralización del MTBE para todos los n-alcanos fue completa, sin embargo destaca la tasa de degradación obtenida con el pentano $76 \text{ mg}_{\text{MTBE}}/\text{g}_{\text{proteína}}/\text{h}$, y es también con este alcano donde se logró la degradación de todos los oxigenantes probados.

Los resultados indican que para el consorcio MI-P hay varios alcanos de cadena corta con posibilidades de ser utilizados cometabólicamente para la degradación completa de oxigenantes específicos.

Índice	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Gasolina y su importancia	3
2.2 Gasolinas Reformuladas (RFG)	4
2.3 La gasolina en México	5
2.4 Consumo de gasolina en México y los EE.UU.	7
2.4.1 El consumo de gasolina en México	7
2.4.2 Comparación del consumo de gasolina entre México y EE.UU.	7
2.5 Uso de oxigenantes en la gasolina	8
2.5.1 Producción y demanda mundial de oxigenantes	9
2.5.2 Producción y demanda de oxigenantes en EE.UU.	10
2.5.3 Oxigenantes en México	10
2.6 Distribución en el ambiente y principales fuentes de emisión	11
2.7 Características de los oxigenantes que influyen en el problema de la contaminación	12
2.8 Problema de contaminación generado por los oxigenantes	14
2.9 Efectos en la salud	15
2.10 Tratamiento del MTBE y oxigenantes	17
2.10.1 Tratamientos fisicoquímicos	17
2.10.2 Tratamientos biológicos	19
2.11 Degradación de MTBE	20
2.12. Degradación heterotrófica	20
2.13 Degradación cometabólica	22
2.14 Estudios de degradación cometabólica	22
2.14.1 Cometabolismo con alcanos	24
2.14.2 Cometabolismo con aromáticos	27
2.14.3 Cometabolismo con alcoholes	28
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	29
3.1 Justificación	29
3.2 Objetivos	29
3.2.1 General	29
3.2.2 Particulares	30
4. MATERIALES Y MÉTODOS	31
4.1 Microorganismos (consorcio MI-P)	31
4.2 Medio Mineral (MM)	32
4.3 Propagación de Microorganismos	32
4.3.1 Inóculo	32
4.4 Microcosmos	33
4.5 Reactivos	34
4.6 Análisis	34
4.6.1 Cromatográficos	34
4.6.2 Proteína	35
4.7 Cálculos realizados	36
4.7.1 Tasas de consumo	36
4.7.2 Coeficiente cometabólico	37
4.7.3. Balances de carbono	37
5. RESULTADOS	39

5.1 Cinética de pentano	39
5.1.1 Desarrollo de la cinética de Pentano y MTBE	39
5.1.2 Tasas de degradación del pentano en presencia de MTBE	41
5.1.3 Tasas de degradación de los oxigenantes en la serie de cinéticas con pentano	42
5.1.4 Producción de CO ₂ en las cinéticas de pentano en presencia de oxigenantes	44
5.1.5 Consumo de O ₂ en las cinéticas de pentano en presencia de oxigenantes	46
5.1.6 Producción de biomasa en las cinéticas de pentano en presencia de oxigenantes.	48
5.2 Otros alcanos	50
5.2.1 Parámetros cinéticos y distribución de la fuente de carbono en las cinéticas de degradación de los n-alcanos.	50
5.2.2 Tasas de degradación de los diferentes oxigenantes en presencia de propano, butano, hexano y heptano.	51
5.3 Análisis general de la distribución de la fuente de Carbono.	52
6. DISCUSIÓN	56
7. CONCLUSIONES	60
BIBLIOGRAFÍA	62
APÉNDICE A. CURVAS ESTÁNDAR	69
A.1 Elaboración de curvas	69
APÉNDICE B. PROTEÍNA	74
B.1 Método Coomassie	74
B.1.2 Cuantificación de proteína por el método de Coomassie	74
B.1.3 Curva de proteína.	75
B.2 Método de Lowry	75
B.2.2 Cuantificación de proteína por el método de Lowry	76
B.2.3 Curva de proteína.	77
APÉNDICE C. PRODUCCIÓN DE CO ₂ , CONSUMO DE O ₂ Y PRODUCCIÓN DE BIOMASA	78
APÉNDICE D. BALANCES DE CARBONO DE LAS CINÉTICAS	91

 Tablas y figuras

Tablas

2.1 Composición de las gasolinas Pemex magna y Pemex premium	6
2.2 Consumo de gasolina en México y en EE. UU.	8
2.3 Características y propiedades físico-químicas de los diferentes oxigenantes	13
2.4 Resumen de los estudios más relevantes sobre cometabolismo	23
4.1 Identificación por 16S-rDNA del consorcio MI-P	31
4.2 Composición del medio mineral	32
5.1 Balance de carbono para los diferentes experimentos con alcanos y oxigenantes	55
D-I Resumen global de la fuente de carbono en CO ₂ de cada uno de los alcanos	91
D-II Resumen global de la fuente de carbono en biomasa de cada uno de los alcanos	91
D-III Resumen global de las fuentes de carbono del MTBE y cada alcano	92
D-IV Resumen global de las fuentes de carbono del TAME y cada alcano	93
D-V Resumen global de las fuentes de carbono del TBA y cada alcano	94
D-VI Resumen global de las fuentes de carbono del TAA y cada alcano	95
D-VII Resumen global de las fuentes de carbono del ETBE y cada alcano	96
D-VIII Resumen global de las fuentes de carbono del DIPE y cada alcano	97

Figuras

2.1 Consumo a nivel mundial de los diferentes oxigenantes	9
2.2 Oxigenantes utilizados en las gasolinas de EE. UU.	10
2.3 Producción de MTBE y TAME por PEMEX	11
5.1 Desarrollo cinético de pentano y MTBE	41
5.2 Tasas de degradación de pentano solo y de pentano más MTBE	42
5.3 Tasas de degradación de los oxigenantes en presencia de pentano	44
5.4 Producción de CO ₂ de las cinéticas de pentano con diferentes oxigenantes	45
5.5 Consumo de O ₂ de las cinéticas de pentano con cada uno de los oxigenantes	47
5.6 Producción de biomasa en las cinéticas de pentano con oxigenantes	49
5.7 Tasas de degradación de los n-alcanos probados	50
5.8 Tasas de degradación de los oxigenantes en presencia de alcanos específicos	52
A-I Curvas estándar de los alcanos	70
A-II Curvas de calibración de los oxigenantes en fase gas	71
A-III Curvas de calibración de los oxigenantes en fase líquida	72
A-IV Curva estándar de CO ₂	73
B-I Curva estándar de proteína por el método de Coomassie	75
B-II Curva estándar de proteína por el método de Lowry	77
C-I Producción de CO ₂ de hexano con los oxigenantes probados	79
C-II Producción de CO ₂ de heptano con los oxigenantes probados	80
C-III Producción de CO ₂ de butano con los oxigenantes probados	81
C-IV Producción de CO ₂ de propano con los oxigenantes probados	82
C-V Consumo de O ₂ de hexano con los oxigenantes probados	83
C-VI Consumo de O ₂ de heptano con los oxigenantes probados	84
C-VII Consumo de O ₂ de butano con los oxigenantes probados	85
C-VIII Consumo de O ₂ de propano con los oxigenantes probados	86
C-IX Producción de biomasa de hexano solo y hexano con cada oxigenante	87
C-X Producción de biomasa de heptano solo y heptano con cada oxigenante	88
C-XI Producción de biomasa de butano solo y butano con cada oxigenante	89
C-XII Producción de biomasa de propano solo y propano con cada oxigenante	90

Abreviaturas (Algunas corresponden a su nombre en inglés)

ABT-1	Amino Benzotriazole
CAAA	Acta de ordenamientos para el aire limpio
C	Carbono
CC	Coefficiente Cometabolico
CO ₂	Bióxido de carbono
DEE	Dietil éter
DHS	Departamento de Salud de California
DIPE	Diisopropil éter
EPA, USEPA	Agencia de Protección Ambiental de los EE. UU. Agencia de Protección Ambiental
ETBE	Etil ter-butil éter
GAC	Carbón activado granular
MI-P	Consortio de microorganismos utilizado
MBD	Miles de barriles por día
MM	Medio Mineral
MON	Número de Octano en Motor
MTBE	Metil ter-butil éter
NAWQA	Programa de asesoramiento de la calidad del agua en los EE. UU:
O ₂	Oxígeno
PIONA	Análisis de parafinas, isoparafinas, olefinas y aromáticos
PMO	Propano monooxigenasa
RFG	Gasolina reformulada
RON	Número de Octano Investigado
SVE	Extracción de vapores del suelo
TAA	Ter-amil alcohol
TAME	Ter-amil Metil éter
TBA	Ter-butil alcohol
TBF	Ter-butil formiato
TEP	Tetraetilo de plomo

1.Introducción

En las últimas décadas el hombre ha tenido un importante avance tecnológico, las necesidades básicas del ser humano crecen por una presión constante que éste hace sobre su entorno; así, ha llegado a ser una necesidad elemental el uso de combustibles para el desarrollo y supervivencia de la sociedad. Los países en el mundo basan su economía y desarrollo industrial en el petróleo y sus derivados. En este esquema mundial se ubica un combustible básico: la gasolina, que ha ido de la mano con la evolución de las sociedades contemporáneas y el desarrollo de gran parte de la tecnología actual.

La necesidad de contar con una gasolina que cumpla con los estándares establecidos por la industria, entre ellos una buena combustión y un alto octanaje nos han obligado a utilizar compuestos sin saber las consecuencias futuras.

Así, como respuesta a esta necesidad se introdujo el uso de compuestos oxigenados en la gasolina, en particular, el Metil ter-Butil éter (MTBE) encontró una amplia aceptación ya que mejora la combustión de la gasolina dentro del motor, bajando la emisión de hidrocarburos no quemados a la atmósfera, aumentando el octanaje en la gasolina y sin causar daños significativos a los motores que utilizan gasolina reformulada.

El creciente uso de este tipo de gasolinas en el mundo ahora, ha generado otro tipo de problema, ya que sobre todo el MTBE por sus características físicas y químicas ha causado contaminación principalmente en mantos acuíferos.

En este marco, la detección cada vez más frecuente de oxigenados de la gasolina en aguas subterráneas, ha causado preocupación ante el daño a uno de los recursos hídricos más importantes para el ser humano, por lo tanto es una exigencia el buscar alternativas para remediar este problema. En este contexto se ubica el desarrollo de este trabajo, que pretende ser de utilidad en la búsqueda de una alternativa biológica viable, para la solución del problema de contaminación por oxigenados de la gasolina.

En el presente trabajo se trata de explicar brevemente el desarrollo, la importancia, la formulación y el uso que se ha dado en la gasolina a nivel mundial, en EE.UU. y México, a partir de la ubicación de estos datos, se pretende hacer un énfasis en la importancia del

uso, la producción y la demanda de los oxigenantes para la reformulación de la gasolina, así como de los costos ambientales y a la salud causados por la contaminación de estos compuestos. Se tratará de enmarcar los principales estudios sobre el tema, además de aquellos en los que el cometabolismo constituye una alternativa viable. Finalmente se analizarán los datos obtenidos y se hará una comparación de este con algunos trabajos importantes sobre el tema.

2. Antecedentes

2.1 Gasolina y su importancia

El creciente uso de la gasolina en el mundo tiene implicaciones en el desarrollo económico por lo que es importante realizar una revisión en este tema, con el fin de comprender la dinámica actual entre el uso de la gasolina y la magnitud de la problemática que encierra la contaminación generada por los aditivos oxigenantes.

La gasolina es un producto de la refinación del petróleo crudo y está formada por una mezcla de hidrocarburos básicos, compuestos oxigenantes y pequeñas cantidades de aditivos. La gasolina tiene un gran número de compuestos químicos, los cuales pueden agruparse en: Parafinas, isoparafinas, olefinas, naftas y compuestos aromáticos, entre los compuestos oxigenantes se encuentra el Metil Terbutil Éter. La fórmula general de la gasolina es C_8H_{17} .

Los hidrocarburos que integran a la gasolina tienen distintas volatilidades, o puntos de ebullición. Algunos de ellos se evaporan más rápidamente que otros, así esta combinación asegura el funcionamiento adecuado del combustible bajo distintas condiciones.

El octanaje en la gasolina es la medida de su calidad antidetonante, es decir, su habilidad para quemarse sin causar detonación en los motores de los automóviles. Esta propiedad se mide con dos índices: Número de Octano Investigado (RON), el cual define la calidad de combustión de la gasolina, y el Número de Octano en Motor (MON). El MON es tomado normalmente como un indicativo de la habilidad del combustible para prevenir la detonación en motores a altas velocidades.

Una gasolina con bajo índice de octano favorece las explosiones dentro del motor, lo que presenta una disminución en la potencia y menor rendimiento de los motores, dañando el motor (Fayolle *et al.*, 2001)

2.2 Gasolinas Reformuladas (RFG)

La última década se ha caracterizado por una profunda preocupación de los gobiernos, enfocada a revertir los problemas del deterioro del medio ambiente; por lo que entre otras medidas, 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 hasta entonces como mejoradores de octano fueron eliminados y en su lugar se comenzó a usar los oxigenantes como el etanol y el MTBE.

En 1990 se creó la Clean Air Act Amendments (CAAA), estableciendo un requerimiento en la adición de oxigenantes a la gasolina en nueve áreas metropolitanas de Estados Unidos para reducir las concentraciones de monóxido de carbono y ozono a un nivel mínimo en los meses de invierno, el MTBE se agregó en concentraciones entre 11 a 15 % (vol) a gasolinas reformuladas (RFG) (Prince 2000, Fiorenza *et al.*, 2003).

La nueva gasolina redujo las emisiones de compuestos precursores de la formación de ozono, de contaminantes tóxicos a la salud y permitió obtener un mejor aprovechamiento de la energía. En su preparación se tomaron en cuenta: los costos, la salud, el impacto ambiental y finalmente el uso eficiente de la energía. (USEPA, 1998).

Si bien existen parámetros internacionales sobre la composición de la gasolina, cada país adecua la formulación del combustible. Dentro de los diferentes hidrocarburos que constituyen a la gasolina algunos están sujetos a regulación entre ellos se encuentran el contenido de benceno, aromáticos y olefinas. El benceno se restringe por ser un compuesto que ha demostrado ser cancerígeno para los seres humanos; los aromáticos y olefinas se controlan porque al quemarse en el automóvil dan origen a compuestos químicos (aldehidos y cetonas) precursores de la formación del ozono en las zonas urbanas. La gasolina también debe cumplir con especificaciones físicas de parámetros como la volatilidad controlada a través de su presión de vapor.

El uso del MTBE en los EE.UU. se extendió dramáticamente en años posteriores debido a su bajo costo de producción (Stocking *et al.*, 2000). De tal manera que llegó a ser el 4to. compuesto químico con mayor producción en este país (Jonhson *et al.*, 2000).

2.3 La gasolina en México

A continuación se presenta la evolución que la gasolina ha tenido nuestro país (PEMEX 2000).

En 1938, al formarse Petróleos Mexicanos, el país consumía gasolina que cumplía con especificaciones muy modestas, de acuerdo con los requerimientos de los motores de aquella época los cuales se satisfacían con 57 octanos. Esta gasolina se preparaba con 3ml/Gal máximo de tetraetilo de plomo (TEP), aditivo utilizado para incrementar su octanaje.

En 1940, apareció en el mercado la primera gasolina formulada por PEMEX a la que se le denominó *Mexolina*. La calidad del combustible se mejoró al incrementar su índice de octano a 70 mínimo.

Hasta el año de 1973 se mantuvieron en el mercado cuatro grados de gasolinas para uso en automotores, con diferentes opciones de octano para satisfacer con amplitud los requerimientos del parque vehicular en México, que incluían desde la *Mexolina*, *Supermexolina*, *Gasolmex* y *PEMEX 100*, con 70, 80, 90 y 100 octanos RON respectivamente, todas conteniendo tetraetilo de plomo.

Posteriormente en 1973, se introdujo el uso de dos nuevas gasolinas, la *Nova* con 81 octanos y 3.5 ml de TEP/Gal (tetraetilo de plomo/Galón) máximo y la *Extra* con plomo de 94 octanos RON y 3.5 ml TEP/Gal máximo. En 1974 a la *Extra* sin plomo con 92 octanos y 0.05 gr. Pb/Gal máximo, que sustituyeron a las cuatro anteriores. Las gasolinas sin plomo se reportan en gramos de plomo por galón en lugar de mL.

A partir de 1982, sin sufrir cambios importantes en su composición básica, la gasolina *Nova* se reformuló con el fin de reducir el uso de tetraetilo de plomo, lo que permitió, sólo en la Ciudad de México, disminuir el impacto ambiental por concepto de plomo en 3,240 toneladas por año. La disminución en el contenido de tetraetilo de plomo en la gasolina *Nova* de 2.49 a 0.78 ml/Gal se llevó a cabo en el periodo de 1981 a 1987, respectivamente.

En 1986, se revisaron las especificaciones en ambos grados, lo que dio origen a las nuevas gasolinas *Nova Plus* y *Extra plus*, teniendo la *Nova*, un rango en el contenido del tetraetilo de plomo de 0.5 y 1.0 ml/gal para el área metropolitana y la *Extra*, 0.05 g Pb/gal máximo.

En 1991, se logró otra reducción del contenido de plomo en la gasolina *Nova*, bajando de 0.73 a 0.36 ml TEP/Gal, con la cual se redujeron las emisiones en 646 toneladas de plomo a la atmosfera con respecto a las emitidas en 1990. Para 1994 se bajó de 0.18 a 0.13 mL TEP/gal, llegando a reducirse en otras 98 toneladas al año. Así apareció la gasolina *Magna Sin*, la palabra Sin significa que es una gasolina sin plomo; su especificación es de 0.01 gr. Pb/Gal máximo, y 87 octanos.

Las gasolinas que se consumen hoy día no tienen plomo y su octanaje es igual al de las gasolinas *Regular* y *Premium* norteamericanas, éstas son la gasolina *Pemex Magna* y la *Pemex Premium* con un mayor índice de octano, ambas de composición similar (Schifter *et al.*, 2000).

La composición de estos dos tipos de gasolina se muestra en la Tabla 2.1 donde se presentan por análisis, PIONA (parafinas, isoparafinas, olefinas y aromáticos) en porcentaje en masa.

Tabla 2.1 Composición de las gasolinas *Pemex magna* y *Pemex premium*

Componentes	<i>Pemex Magna</i>	<i>Pemex Premium</i>
n-parafinas	10.635	6.193
i-parafinas	39.278	51.844
Olefinas	6.280	4.301
Naftenos	4.485	1.873
Aromáticos	31.508	27.256
Oxigenantes	7.579	8.420
Pesados y no identificados	0.235	0.112

(Zambrano *et al.*, 2002).

La gasolina más usada en México, es la gasolina *Magna* y las diferencias de ésta con la gasolina *Premium* se dan en la composición de las i-parafinas, los naftenos y los oxigenantes.

2.4 Consumo de gasolina en México y los EE.UU.

Como un importante antecedente vale la pena conocer algunos datos sobre el consumo de gasolina en México, y así mismo hacer una comparación con el país más industrializado del mundo y que más gasolina consume a nivel mundial.

2.4.1 El consumo de gasolina en México

La ciudad de México es el centro político, económico y cultural del país. Actualmente con cerca de 16.6 millones de habitantes (aproximadamente 20% de la población total del país). La Zona Metropolitana del Valle de México es uno de los centros urbanos más grandes del mundo 18 millones de litros de gasolina son manejados diariamente para abastecer de combustible a cerca de 2.7 millones de vehículos registrados y se estima que en la ciudad de México se consume aproximadamente el 25% de la gasolina del todo el país (Schifter *et al.*, 2000a).

Las ventas de gasolina en el 2001 por PEMEX fueron de aproximadamente 84.7 millones de litros por día (532.7 Miles Barriles Día (MBD)) y se produjeron tres tipos de gasolina con un volumen total de 134.5 millones de litros diarios (846 MBD) incluyendo las gasolinas: *PEMEX Magna*, *Nova/Base*, *PEMEX Premium* y otras gasolinas correspondiendo a 51, 44, 4 y 1 % de la producción global para cada una de ellas. Las refinerías donde se producen son Cadereyta, Madero, Tula, Salamanca, Minatitlán y Salina Cruz. Adicionalmente en el 2001 se importaron 21.8 millones de litros diarios (137 MBD) (PEMEX 2001).

2.4.2 Comparación del consumo de gasolina entre México y EE.UU.

La Tabla 2.2 presenta los consumos totales a nivel país en comparación con EE.UU. En México en 1998 se consumieron globalmente 81.4 millones de litros (512 MBD) de los cuales 30.5 millones de litros diarios (192 MBD) correspondieron a gasolinas oxigenadas. En ambos países en ese año la proporción de gasolina oxigenada usada fue de 38%, sin embargo el consumo en EE.UU. es 16 veces mayor a México, siendo en consumo per

capita de aproximadamente 0.8 y 4.8 Litros por persona en México y EE.UU., respectivamente.

Tabla 2.2. Consumo de gasolina en México y en EE.UU.

Propiedad	México	EE.UU.
Area de país (miles de Km ²)	1,959	9,364
Población (millones)	94	268
Consumo de gasolina (MBD) (1998)	512	8,184
Consumo de gasolina oxigenada MBD (1998)	192	3,260

MBD= miles de barriles por día
(Schifter *et al.*, 2001).

2.5 Uso de oxigenantes en la gasolina

Inicialmente los oxigenantes se mezclaron en la gasolina para desplazar el plomo, aumentar la tasa de octano y posteriormente se les utilizó para disminuir los aromáticos.

Entre los compuestos que se agregan a la gasolina se encuentran algunos alcoholes, especialmente metanol, etanol y ter-butil alcohol (TBA), o éteres tales como el metil ter-butil éter (MTBE), etil ter-butil éter (ETBE), y el ter-amil metil éter (TAME). Los éteres son generalmente preferidos a los alcoholes ya que éstos últimos pueden ser corrosivos en algunos materiales usados en máquinas e incluso pueden presentar problemas de separación de fases cuando se mezclan con hidrocarburos (Vautrain, 1999). El MTBE es el más usado por la industria debido a su bajo costo, a su fácil producción por las refinerías, a sus características favorables para mezclarse con otros componentes de los combustibles, y no se separa de la gasolina en presencia de agua, en los sistemas de distribución, de suministro, y en los propios automóviles.

El MTBE se obtiene principalmente al hacer reaccionar *isobutileno* con *metanol* en presencia de un catalizador ácido por un rompimiento catalítico o una dehidrogenación de butano, a nivel industrial se utiliza columnas de destilación catalíticas, en donde se lleva a cabo la reacción y separación de los productos. El TAME es producido por una reacción de metanol en isoamileno; el ETBE es usado en España y en Francia y es formado por una reacción de isobutileno con etanol, permitiendo el uso indirecto de etanol de origen agrícola (Torck, 1999). El metanol es producido principalmente a través de la síntesis de

una mezcla de carbono e hidrógeno. La reserva de alimentación principal para la producción de metanol es gas natural, a pesar de que otros destilados del petróleo y carbón pueden usarse.

2.5.1 Producción y demanda mundial de oxigenantes

El uso mundial de oxigenantes, en particular de metil ter-butil éter (MTBE), como compuestos de la gasolina ha crecido sustancialmente desde principios de la década pasada. Este crecimiento se ha dado como respuesta a los requerimientos de reducción de emisiones de la combustión en automotores para atenuar el problema de contaminación atmosférica en las ciudades. Actualmente, se estima que la demanda mundial de oxigenantes es de 657 MBD (miles de barriles por día), de los cuales el 72% son éteres como el MTBE, Ter-amil metil éter (TAME) y el Etil Ter-butil éter (ETBE) que provienen del petróleo y el resto es etanol anhidro que proviene de fuentes renovables Fig. 2.1 (González 2001).

En varios países los oxigenantes se han producido en volúmenes crecientes desde los años setenta. El MTBE figura actualmente entre los 50 productos químicos de mayor producción en volumen a nivel mundial (Reich 1994).

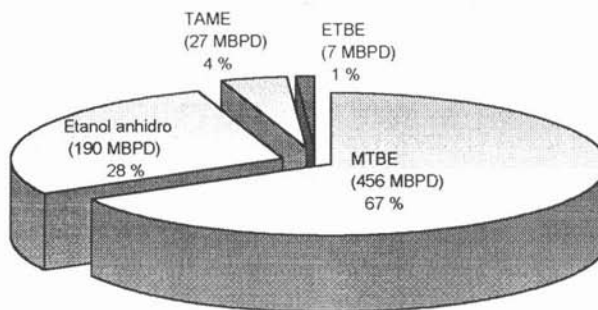


Figura 2.1 Consumo a nivel mundial de los diferentes oxigenantes. (González 2001)
(MBD) miles de barriles por día

2.5.2 Producción y demanda de oxigenantes en EE.UU.

Estados Unidos es el mayor consumidor de MTBE en el mundo debido a su demanda de gasolina y a la implantación de programas de reformulación y oxigenación de las mismas. Es el consumidor de aproximadamente el 61 % de la demanda mundial pero también es el mayor productor ya que produce el 44 % del total (Fayolle *et al.* 2001).

Para 1993 el consumo de MTBE excedió los 24 millones de toneladas haciéndolo el segundo producto químico en los EE.UU. (Reich 1994).

A partir de 1994 y hasta 1999, el 30% de las gasolinas utilizadas en EE.UU. estaban oxigenadas, ya para el 2001 el MTBE se utilizó en el 80% de los combustibles oxigenados en EE.UU. Figura 2.2 (Faulk *et al.*, 2001).

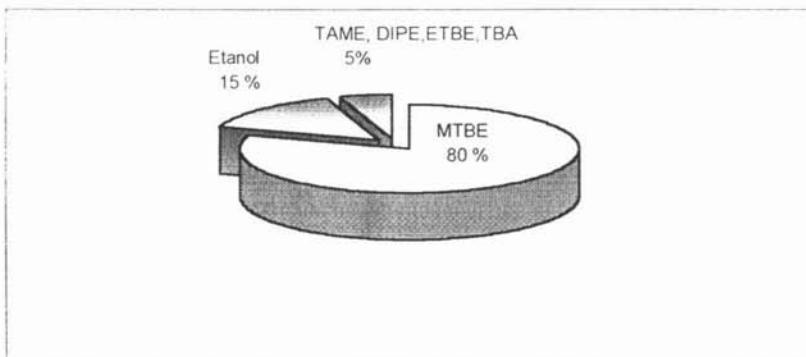


Figura 2.2. Oxigenantes utilizados en las gasolinas de EE.UU. Bauman (1999).

2.5.3 Oxigenantes en México

En nuestro país para el invierno de 1993 se sustituyó, de manera extensiva, el tetraetilo de plomo por MTBE (9% peso) en la gasolina *Magna* y es equivalente a la "*Unleaded Regular*" (gasolina regular sin plomo) de EE. UU. con 87 de índice de Octano (PEMEX 2000).

Dos compuestos oxigenantes se elaboran en México, el TAME y el MTBE. En la Fig. 2.3 se presentan los datos de producción de estos compuestos por PEMEX en los períodos de 1999 a 2001.

México adiciona MTBE a todas sus gasolinas y ha construido plantas para la producción de los aditivos oxigenantes (MTBE y TAME) en las refinерías de Tula, Salamanca, Cadereyta y Salina Cruz. (Favela 2000).

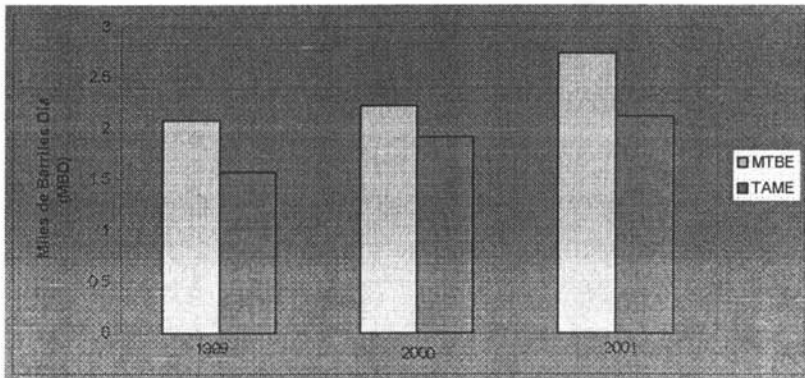


Figura 2.3. Producción de MTBE y TAME por PEMEX (Anuario estadístico petroquímica 2001, Secretaría de Energía).

La producción en promedio es de 2.3 y 1.8 MBD (Fig. 2.3) para el MTBE y TAME, respectivamente. Si se considera que en la ciudad de México se consumen 18 millones de litros diarios de gasolina y considerando que el MTBE se encuentra en una proporción de aproximadamente 9% se necesitarían aproximadamente 10 MBD, de esta manera, la producción del país no es suficiente y el resto se importa principalmente de EUA. (Favela 2000).

2.6 Distribución en el ambiente y principales fuentes de emisión

Las fuentes de liberación al ambiente son: fugas de los tanques de almacenamiento subterráneos, por derrames y evaporación durante la obtención y transporte de oxigenantes o gasolina reformulada con estos, también por accidentes durante el transporte a través de tuberías subterráneas.

Por estos vectores, y por su alta solubilidad en agua, se hace evidente que el MTBE principalmente se encuentra contaminando acuíferos subterráneos. Aunque en menor proporción también se encuentra en aguas superficiales, en este caso ocurre por liberación directa, precipitación pluvial, por descargas de agua subterránea contaminada,

o por emisiones de vehículos acuáticos, siendo éste el principal vector contaminante en lagos, grandes ríos, presas, y pequeñas bahías.

La volatilización de la fase agua-aire, es el principal mecanismo de pérdida del MTBE, en lagos y grandes reservorios de agua superficial. La pérdida de MTBE sigue un decaimiento exponencial con más del 80% que se volatiliza en dos o tres semanas, esto se debe a la alta volatilidad del compuesto. Si el MTBE es transportado a aguas más profundas la tasa a la cual se pierde es mucho más lenta.

2.7 Características de los oxigenantes que influyen en el problema de la contaminación

El metil ter-butil éter (MTBE) es un compuesto orgánico sintético, estable, incoloro, con olor fuerte y flamable por su contenido de oxígeno. En la Tabla 2.3 se presentan varias propiedades de los oxigenantes.

El MTBE es un compuesto altamente soluble con una baja constante de la ley de Henry (ver Tabla 2.3), se disuelve rápidamente en agua, por lo que la porción disuelta en agua es mayor que la que se encuentra disuelta en el aire. Su solubilidad en agua es de aproximadamente 50,000 mg/L (Squillace *et al.*, 1997).

Una constante de Henry adimensional de 0.05 o mayor indica que es un compuesto químico volátil, y como se observa en la Tabla 2.3, a excepción del TBA y el TAA los éteres son volátiles siendo el MTBE el más volátil. Por esta característica estos pueden fácilmente migrar (volatilizarse) a la atmósfera desde su estado líquido, en el aire el MTBE tiene una vida media de tres días antes de reaccionar con otros compuestos en la atmósfera, en la superficie del agua tiene una vida media de 9 h. antes de volatilizarse, pero su vida media se amplía al encontrarse disuelto en cuerpos de agua estancadas o subterráneas (Fiorenza *et al.*, 2003).

Una K_{oc} tan baja como la del MTBE nos indica una capacidad limitada para ser absorbido, el coeficiente de absorción es una habilidad química para sorber o unirse a partículas del suelo. Con estas características físico-químicas la presencia del MTBE es frecuente en sitios contaminados con gasolina, encabezando la migración de los componentes de esta. Lo anterior se debe a su alta movilidad y a que durante el transporte de dichos

compuestos, el MTBE no es biodegradable, por esta razón se dice que es un compuesto recalcitrante.

Tabla 2.3. Características y propiedades físico-químicas de los diferentes oxigenantes

Nombre químico	Metil ter-butil éter	Ter-amil metil éter	Etil ter-butil éter	Diisopropil éter	Ter-butil alcohol	Ter-amil alcohol
Sinónimos comunes	MTBE; 2-Metoxi-2-metilpropano; ter-butil metil éter; metil terciario butil éter.	TAME; 2-metoxi-2-metil butano; metil ter-pentil éter; 1,1-dimetilpropil metil éter.	ETBE; ter-butil etil éter; propano-2-etoxi-2-metil; 1,1-dimetil etil éter.	DIPE; 2-2-axybispropano; 2-isopropoxi-propano; éter diisopropílico.	TBA; 2-metil-2-propanol.	TAA; Ter-pentil alcohol, 2-Metil-2-butanol, dimetil etil carbinol, etil dimetil carbinol, ter-pentanol.
Fórmula molecular	C ₅ H ₁₂ O	C ₇ H ₁₄ O	C ₇ H ₁₄ O	C ₆ H ₁₂ O	C ₄ H ₁₀ O	C ₅ H ₁₂ O
Fórmula estructural	CH ₃ OC(CH ₃) ₃	CH ₃ CH ₂ C(CH ₃) ₂ OCH ₃	(CH ₃) ₂ COCH ₂ CH ₃	(CH ₃) ₂ CHOCH(CH ₃) ₂	(CH ₃) ₂ COH	(CH ₃) ₂ COH CH ₂ CH ₃
Peso molecular (g mol ⁻¹)	88.15	102.18	102.18	102.18	74.12	88.15
Punto de fusión (°C)	-109		-103	-86.9	25.8	9
Punto de Ebullición (°C a 1 atm)	55.2	86.3	72.2	68.2	82.4	102
Presión de vapor (mmHg a 25°C)	240	75	130	159	41	12 mmHg a 20°C
Densidad (Kg L ⁻¹ a 20°C)	0.7404	0.77	0.7495	0.7258	0.7858	0.8084
Solubilidad (g/100g de agua)	4.8	1.2	1.2	0.2	Miscible	Altamente soluble en agua
Constante de la Ley de Henry (Atm·m ³)/(g·mol)	5.5 X 10 ⁻² a 3 X 10 ⁻²	1.95 X 10 ⁻³	2.64 X 10 ⁻²	4.77 X 10 ⁻³	1.21 X 10 ⁻⁵	
Adimensional	2.2 X 10 ⁻² a 1.2 X 10 ⁻¹	0.081	0.11	0.199	5.03 X 10 ⁻⁴	-
Log K _{ow}	0.55 a 0.91	NA	NA	1.13	1.57	-
Log K _{oa}	0.94 a 1.30	NA	NA	1.52	0.35	-

Adaptada de (Fayolle et al., 2001) y EPA 1998(EPA/600/R-98/048)

La densidad de las sustancias es otra forma de indicar la capacidad que tienen de disolverse o no, si tienen una densidad más alta que el agua se "hundirán" mientras si tienen densidad menor "flotan", como se puede observar en la Tabla 2.3, tanto los éteres como los alcoholes tienen una densidad entre 0.72 y 0.78 así que una vez que la saturación en el agua ocurre estos compuestos tienden a flotar en la superficie del agua.

El umbral para el sabor y el olor del MTBE en agua para beber se da en concentraciones de alrededor de 2.5 partes por mil millones* para el olor y de 2.0 para el sabor (USEPA 2000). El MTBE huele como a terpeno o turpento, algunas personas reportan un sabor medicinal, cítrico, o como menta (Jacobs *et al.*, 2001).

2.8 Problema de contaminación generado por los oxigenantes

El uso de los oxigenantes en la gasolina fue implementado en áreas de los EE.UU. que no cumplían con el estándar de la calidad del aire. Como ya se mencionó anteriormente esta medida se adoptó en nueve zonas metropolitanas, y efectivamente se logró disminuir las emisiones de monóxido de carbono en estas áreas sobre todo en época invernal. Así, la CAAA ordenó simultáneamente la entrada al programa de gasolinas reformuladas con oxigenantes, a otras zonas con problemas de contaminación ambiental. El oxigenante más comúnmente utilizado en las gasolinas reformuladas fue el MTBE.

El área de comercialización más importante del MTBE en los EE. UU. es California. La calidad del aire en este estado mejoró debido al uso del MTBE en la gasolina. Sin embargo, el caso más notorio de contaminación debido al uso del MTBE, se presentó en la ciudad de Santa Mónica, esta ciudad utiliza agua subterránea de dos pozos el Arcadia y el Charnock, para abastecer alrededor del 50% del agua para beber de la ciudad. En agosto de 1995 en el pozo Charnock se detectó MTBE, y para abril de 1996 la concentración había aumentado a 610 µg/L, por lo que los cinco puntos de este pozo en la ciudad fueron cerrados, el resultado de la investigación sobre este caso determinó que la contaminación fue el resultado de fugas en 25 tanques de almacenamiento subterráneo de gasolina, mientras que el pozo Arcadia fue contaminado por una estación de servicio (USEPA 2000).

Como consecuencia de éste y otros casos de aguas contaminadas en marzo de 1999, California y Maine determinaron eliminar el uso del MTBE de la gasolina. El gobernador de California ordenó la remoción total del MTBE en el estado para el 2003. En julio de 1999 en New Hampshire la ley redujo el uso del MTBE, y requirió a la USEPA un

* En la fuente el autor usa las unidades partes por billón (ppb). En Europa y Latinoamérica se lee como partes por mil millones.

seguimiento del problema de contaminación de aguas subterráneas con este oxigenante hasta el año 2002, con el propósito de establecer nuevos requerimientos en las RFG. En los estados de Arizona, Kansas, Missouri, Nueva York, y el sur de Dakota se propuso limitar el uso del MTBE (USEPA 2000).

Hacia 2001 en los Estados Unidos se encontraron aguas subterráneas contaminadas en alrededor de 250,000 sitios examinados (Jacobs *et al.*, 2001).

La National Water Quality Assessment Program (NAWQA) de EE.UU. encontró que el MTBE fue detectado en este país con una frecuencia de 16.9% en pozos de aguas urbanas y 3.4% en pozos de agua rurales (Fiorenza *et al.*, 2003).

Debido a que el ETBE y el TAME son menos utilizados en procesos que provocan contaminación, estos se han encontrado en menor proporción en aguas subterráneas.

A pesar de las propiedades atractivas de el MTBE, el uso continuo de este oxigenante en la gasolina es ahora muy controversial (Fayolle *et al.*, 2001).

Hay pocos reportes en México acerca de la aparición del MTBE en el ambiente, entre estos se encuentra el de Reyna *et al.*, 2001, que encontró este oxigenante en concentraciones de 11.5 ppb en el aire, estas muestras monitoreadas en una estación de servicio. Manzanares *et al.*, 2001 monitoreo emisiones de vehículos en movimiento y encontró al oxigenante en 4.4 ppb. Otros trabajos reportan haber encontrado concentraciones de MTBE de entre 100-1500 mg/kg suelo, en suelos de distribuidoras de gasolina y estaciones de servicio (Iturbe *et al.*, 2003). En aguas subterráneas cercanas a las estaciones de gasolina los reportes ubican concentraciones de el rango de 4-87 mg/L de MTBE. Afortunadamente, el MTBE no fue detectado en cerca de los 33 pozos de agua para beber que fueron monitoreados por Buenrostro y Dovalí 2000.

2.9 Efectos en la salud

La forma en la cual un compuesto que causa efectos nocivos a la salud entra a cualquier organismo, influye en el tipo de daño que se manifiesta, en el caso de los oxigenados es, posiblemente la ingestión de agua contaminada el principal mecanismo de exposición. El

riesgo para la salud que representan los oxigenados ha sido estudiado ampliamente a partir del conocimiento que se tiene de los numerosos casos de contaminación de agua utilizada para el consumo humano y de manera especial se enfatizan las investigaciones en el MTBE por su uso tan extensivo.

El MTBE entra al cuerpo por inhalación de aire contaminado, adsorbido por la piel o por el consumo de alimentos o agua contaminados. La ingestión de agua de pozos contaminados con MTBE, puede ocurrir de manera casual o frecuente, es menos probable la exposición al contacto con la piel, ésta sólo se da en caso de bañarse o lavar con aguas contaminadas, y con gente que trabaje en estaciones de servicio o mecánicos.

La información científica sobre la valoración del MTBE como cancerígeno para los humanos viene de investigaciones en animales (Jacobs *et al.*, 2001).

Resultados de estudios de exposición crónica de ratas y ratones al MTBE sugieren que éste es cancerígeno, y causa diferentes tipos de cáncer como leucemia y linfoma así como tumores en hígado, riñones y testículos, en riñón por ejemplo el cáncer puede ser causado por la estimulación de una o más proteínas únicas en ratas macho (Jacobs *et al.*, 2001).

Sin embargo, su calificativo como cancerígeno en humanos no es definitivo porque los mecanismos de carcinogénesis pueden ser diferentes a los que tienen lugar en los roedores. Los otros efectos tóxicos para los humanos son menos importantes (Fayolle *et al.*, 2001).

A pesar de ello, existen otros estudios donde se señala el riesgo de desarrollar cáncer en humanos por una exposición al MTBE (Jacobs *et al.*, 2001).

Al MTBE se le ha asociado con enfermedades respiratorias y alérgicas, incluyendo dolor de cabeza, ansiedad, falta de concentración, y náuseas entre otras (Jacobs *et al.*, 2001).

En ratones se ha observado que después de inhalado o ingerido el MTBE se distribuye al cerebro, hígado y riñón. El TBA (metabolito de MTBE) ha causado daño en riñones y

tiroides. Las consecuencias a la salud humana debida a la respiración o consumo de pequeñas cantidades de MTBE por periodos prolongados de tiempo son desconocidos.

En 1997, la EPA clasificó al MTBE como un compuesto potencialmente cancerígeno en altas concentraciones, pero en concentraciones de entre 20 y 40 µg/L la probabilidad de causar efectos adversos en la salud es baja. Sin embargo, en 1998 la EPA en California propuso 14 µg/L como la concentración a la cual se incrementa el riesgo de desarrollar cáncer, este riesgo es de uno en un millón cuando la exposición al contaminante es oral. (USEPA 2000, Keller *et al* 2001).

En 1999, el Departamento de Servicios de Salud de California (DHS) propuso en 13 µg/L el nivel máximo del contaminante MTBE en suministros de agua, esta concentración no se debía exceder en los suministros de aguas públicas del estado.

Para otros oxigenantes de la gasolina hay muy pocos datos disponibles acerca de su toxicidad.

2.10 Tratamiento del MTBE y oxigenantes

2.10.1 Tratamientos fisicoquímicos

Las características físico-químicas del MTBE y de otros oxigenantes han incrementado la magnitud del problema en la contaminación, el tratamiento para la limpieza de aguas, superficies y materiales subterráneos contaminados dependen en parte de éstas.

En aguas subterráneas, el transporte de MTBE está controlado por el tipo de flujo de agua, la cantidad de contaminante, y la dispersión. El transporte del MTBE se ve poco afectado por la adsorción de las partículas del suelo y por la biodegradación debido a la alta movilidad del oxigenante.

Los diferentes procesos disponibles para la remoción de contaminantes de suelos, mantos freáticos y agua potable, se basan en las características físico-químicas de cada contaminante. Así basado en la alta presión de vapor del MTBE y su baja afinidad por carbono orgánico en suelos, se propuso la extracción de vapores del suelo (SVE), un

proceso de remediación *in situ*, y otros procedimientos *ex situ* como la desorción térmica donde se aprovecha la volatilidad del MTBE (USEPA 1995).

En aguas contaminadas, los éteres pueden removerse aprovechando la volatilización de la interfase aire-agua, este mecanismo es eficiente para la remoción de MTBE de las aguas superficiales simplemente arrastrando aire, sin embargo, en aguas más profundas la baja constante de Henry del MTBE lo hace muy soluble, y entonces el arrastre con aire es pobre. Dos de los procedimientos más atractivos para la remoción del MTBE de estas aguas son la extracción con aire y la adsorción con carbón activado granular (GAC) en el primer caso los componentes volátiles son transferidos del agua extraída del subsuelo al aire, pasando por una columna de empaque capaz de atrapar al MTBE, en el segundo caso, los contaminantes que están en solución se adsorben a la superficie de un sorbente, y éste puede ser el GAC. Para el primer caso la volatilización del MTBE es difícil por su alta solubilidad, además en el agua contaminada por MTBE normalmente también se detectan hierro, calcio y magnesio. Estos compuestos se depositan en el material de empaque de la columna, y entonces se requiere de un período de limpieza de la columna con una solución ácida, o el reemplazo del material de empaque. Por ésta y otras limitaciones técnicas este proceso es altamente costoso, ya que el tratamiento de un efluente contaminado con MTBE es de 50 a 150 veces más caro que tratar un efluente contaminado con benceno con el mismo tratamiento (Keller *et al.*, 2001). Una constante de Henry similar para el ETBE y el TAME sugieren costos parecidos para el tratamiento con extracción de aire, así mismo se considera un método no adecuado para el tratamiento del TBA del TAA. El GAC tiene la desventaja enorme de que en los efluentes contaminados también se presenta materia orgánica y otros químicos orgánicos disueltos, que tienen una afinidad más grande al carbón que el MTBE, estos lo desplazan de los sitios de absorción, reduciendo enormemente la eficiencia de remoción del contaminante, e incrementando la tasa del uso del carbón, el costo de tratamiento por este método oscila entre 110 y 560 % más caro, que el tratamiento de aguas con benceno (Keller *et al.*, 2001).

Debido a la capacidad limitada de adsorción del carbón activado para el MTBE, no se considera adecuada para su remoción en gran escala.

Las características de los oxigenantes, además de influir notablemente en los tratamientos físico-químicos de la gasolina, también influyen de manera notable en los tratamientos biológicos

2.10.2 Tratamientos biológicos

En suelos y acuíferos la atenuación natural de un contaminante está esencialmente controlada por la migración del contaminante y su biodegradación. En estos ambientes, sólo la biodegradación puede contemplar la remoción definitiva del contaminante (Prince 2000).

En el ambiente existe una amplia gama de microorganismos, los cuales regulan una gran cantidad de procesos físicos, químicos, y biológicos, estos microorganismos se encuentran en casi todos los ambientes, y son capaces de degradar una gran cantidad de compuestos y materia orgánica. Estas transformaciones han sido causa de estudios extensivos, sobre todo aquéllas en que los microorganismos son capaces de degradar compuestos recalcitrantes en la naturaleza, utilizándolos como fuente de carbono y energía, para producir CO₂, agua y biomasa. La presencia de estos microorganismos en suelos y aguas subterráneas es responsable de la atenuación de la contaminación.

Los compuestos que contienen enlaces éter en sus estructuras son comunes en el ambiente, ya que suelen ser muy estables. Por ejemplo la lignina es el segundo polímero más abundante en la naturaleza, formado por monómeros unidos por puentes de éter, y es resistente a la biodegradación. La existencia de compuestos naturales con uniones éteres son importantes para explicar la presencia de microorganismos capaces de degradar uniones éteres recalcitrantes (Fayolle, *et al* 2001).

Por lo anterior los tratamientos biológicos ofrecen una alternativa atractiva para la limpieza de sitios contaminados con oxigenados de la gasolina, esta afirmación se basa en algunos estudios realizados con compuestos presentes en la naturaleza con enlace éter, donde se ha observado la existencia de mecanismos bioquímicos en microorganismos, capaces de convertir estos enlaces éter estables, en un hemiacetal inestable que es más

sencillo de degradar, esta reacción es llevada a cabo por oxigenasas que hidroxilan a los grupos carbono $-\text{CH}_2$ o CH_3 adyacentes al enlace éter (Fayolle *et al.*, 2001).

Actualmente existen tratamientos biológicos que se aplican a sitios contaminados, pero en todos ellos el factor que determina su buen funcionamiento es la presencia de microorganismos adecuados para la degradación.

2.11 Degradación de MTBE

Con el reconocimiento de la contaminación por el MTBE, hay un creciente interés en la biodegradación de éste y de otros oxigenantes, las estructuras químicas de estos compuestos sugieren resistencia a la biodegradación, así pues la estructura, presente en el grupo butil-terciario del MTBE y el ETBE, y TAME los hace más estables y menos susceptibles a la degradación.

La biodegradación del MTBE se aborda desde diferentes aspectos, pero todos confluyen en el mismo punto, esto es, lograr una remoción total del oxigenante. De esta manera existen reportes sobre degradación aerobia enfocados, en la degradación heterotrófica (metabolismo directo) y en la degradación cometabólica.

Las investigaciones durante los últimos 20 años han cambiado la opinión acerca de la biodegradabilidad de los oxigenantes. Los primeros reportes en biólodos, sedimentos y agua subterránea pusieron en evidencia al MTBE como un compuesto recalcitrante, Fujiwara *et al.*, 1984 trabajo donde no se observó degradación aerobia de MTBE en lodos, Sufliya y Mormile 1994, determinaron que oxigenantes con átomos de carbono terciarios y cuaternarios eran más recalcitrantes que algunos químicos ramificados relacionados. Sin embargo, como se mostrará a continuación reportes recientes demuestran la biodegradabilidad del MTBE como única fuente de carbono y energía, por cometabolismo, o anaerobia.

2.12. Degradación heterotrófica

La degradación heterotrófica se refiere al metabolismo donde el MTBE se usa como única fuente de carbono y energía.

El primer reporte de biodegradación aeróbica de MTBE fue de Salanitro *et al.*, (1994), el crecimiento de microorganismos fue lento, con un rendimiento entre 0.21 a 0.28 g células peso seco/g MTBE usado. Se detectó TBA como metabolito en la degradación.

El cultivo utilizado por Cowan y Park (1996), fue probado con cinco compuestos como única fuente de carbón y energía, estos fueron MTBE, ETBE, TAME, TBA, y TAA fueron degradados a 30°C. El TBA se detectó como intermediario de la degradación de MTBE, y ETBE, pero el TAA no fue observado como un intermediario de la degradación del TAME, esto posiblemente se debió a que la cinética de degradación del TAME fue muy rápida. La tasa máxima de crecimiento específico (μ_{max}), para todos los compuestos fue baja, entre 0.017 a 0.057 h, para el MTBE fue de 0.036 h.

A partir de este trabajo el número de reportes de microorganismos que degradan el MTBE se ha incrementado así hay cepas aisladas de los géneros, *Rhodococcus* (Salanitro *et al.*, 1994), *Hydrogenophaga flava* F55 (Hatzinger *et al.*, 2001), *Rubrivivax gelatinosus* PM1 (Hanson *et al.*, 1999 y Deeb *et al.*, 2001), *Mycobacterium austroafricanum* (Francois *et al.*, 2002), además de cultivos mixtos que han sido estudiados en bioreactores (Fortin y Deshusses 1999, Cowan y Park 1996). Otros cultivos mixtos han sido aislados de agua contaminada (Kane *et al.*, 2001), o de suelos contaminados con derrames de gasolina (Kharoune *et al.*, 2002), e inclusive cultivos mixtos que han sido adaptados creciéndolos en presencia de MTBE (Sedran *et al.*, 2002 y Wilson *et al.*, 2002).

En la mayoría de los trabajos sobre degradación heterotrófica de oxigenantes, las tasas de degradación del MTBE normalmente están entre 1.8-110.9 $mg_{MTBE}/g_{proteina}/h$ (Fayolle *et al.*, 2001) aunque existe un reporte con un valor de 454 $mg_{MTBE}/g_{proteina}/h$ (Hatzinger *et al.*, 2001). El rendimiento celular en la mayoría de los reportes oscila entre 0.1– 0.2 $g_{proteina}/g_{MTBE}$ (Hanson *et al.*, 1999, Salanitro *et al.*, 1994), en últimos trabajos se ha tenido un mejor rendimiento al degradar MTBE en alrededor de 0.44 $g_{proteina}/g_{MTBE}$ (Francois *et al.*, 2002).

En general la degradación de los oxigenados de la gasolina (éteres y alcoholes), presenta una tasa específica de consumo alta. Sin embargo se debe esperar un largo periodo para la adaptación y proliferación celular de los microorganismos, de tal manera que puedan

ser capaces de degradar exitosamente a los oxigenados cuando se usan como única fuente de carbono y energía.

2.13 Degradación cometabólica

El cometabolismo es la transformación metabólica de una sustancia cuando una segunda sustancia sirve como fuente de carbono o energía primaria. Es el mecanismo de transformación de un compuesto orgánico usado por un microorganismo que es incapaz de utilizarlo, como única fuente de carbono y energía. Bajo estas condiciones la adición de otra fuente le permite utilizar el compuesto cometabolizado como energía disponible para el microorganismo, pero no es incorporado a la célula para su biosíntesis.

Este proceso involucra la producción de una enzima o grupo de enzimas que cambian el compuesto orgánico a un subproducto que es posteriormente transformado por otras enzimas para que el microorganismo lo incorpore a su metabolismo.

El mecanismo de biodegradación cometabólica del MTBE ha recibido una atención especial debido a que este mecanismo puede jugar un papel importante en el proceso de acelerar la atenuación natural.

2.14 Estudios de degradación cometabólica

La degradación cometabólica del MTBE ha sido reportada por un gran número de estudios, en ellos se ha encontrado que la degradación del MTBE es posible con alcanos de cadena corta, con algunos compuestos aromáticos, e inclusive con algunos alcoholes.

En la tabla 2.4 se presenta un resumen de los trabajos más importantes sobre la degradación cometabólica del MTBE y algunos oxigenantes relacionados.

Tabla 2.4. Resumen de los estudios más relevantes sobre cometabolismo

Investigador	Microorganismo o Consorcio	Sustrato	Oxigenante Cometabolizado	Tasa de remoción (mg/g _{proteína} /h)				
				MTBE	TBA	ETBE	TAME	DIPE
Steffan <i>et al.</i> , 1997	<i>Nocardia sp.</i> ENV425	propano	MTBE, ETBE, TBA y TAME	24.9	7.104	+ nd	+ nd	nd
Steffan <i>et al.</i> , 1997	<i>Nocardia sp.</i> ENV421	propano	MTBE, TBA, ETBE	48.6	10.65	+ nd	nd	nd
Steffan 1997	<i>Mycobacterium vaccae</i> JOB5	propano	MTBE, TBA, ETBE	+ nd	+ nd	+ nd	nd	nd
Steffan 1997	<i>Pseudomonas putida</i> CAM ATCC 17453	alcanfor	MTBE	2.1	nd	nd	nd	nd
Hardison <i>et al.</i> , 1997	<i>Graphium sp.</i>	Propano, butano	MTBE, TBA	0.88	+ nd	nd	nd	nd
Hyman <i>et al.</i> , 1998	<i>Mycobacterium vaccae</i> JOB5	2-Metil-propano	MTBE	121.4	nd	nd	nd	nd
Garnier <i>et al.</i> , 1999	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pentano	MTBE	20.6	4 257	nd	nd	nd
Hyman & O'Reilly 1999	<i>Mycobacterium vaccae</i> JOB5	Hexano	MTBE	110.9	nd	nd	nd	nd
Hyman & O'Reilly 1999	<i>Alicygenes eutrophus</i>	Butano	MTBE	79.2	nd	nd	nd	nd
Hyman & O'Reilly 1999	<i>Alicygenes eutrophus</i>	2-Metil-butano	MTBE	78.7	nd	nd	nd	nd
Hyman & O'Reilly 1999	<i>Pseudomona mendocina</i>	2-Metil-pentano	MTBE	21.1	nd	nd	nd	nd
Hyman <i>et al.</i> , 2000	<i>Rhodococcus sp</i> CT2	Propano	MTBE	61.8	nd	nd	nd	nd
Hyman <i>et al.</i> , 2000	<i>Rhodococcus sp</i> CT2	Pentano	MTBE	96.6	nd	nd	nd	nd
Hyman <i>et al.</i> , 2000	<i>Rhodococcus sp</i> CT2	Isobutano	MTBE	24.3	nd	nd	nd	nd
Piveteau <i>et al.</i> 2000	<i>Gordonia terrae</i> IFP 2001	Etanol	MTBE	82.4	-nd	nd	nd	nd
Corcho <i>et al.</i> , 2000	Cultivo ciclohexano-oxidante	Ciclohexano	MTBE, TBA, ETBE, DIPE, TAME	6.4	1.02	1.9	9.2	1.4
Liu <i>et al.</i> , 2001	<i>Arthrobacter</i>	Butano	MTBE y TBA	35.8	+nd	nd	nd	nd
Hernandez-Perez <i>et al.</i> , 2001	<i>Gordonia terrae</i> IFP 2007	Etanol	MTBE, TAME	74.0	nd	nd	275.9	nd
Smith <i>et al.</i> , 2003	<i>Mycobacterium vaccae</i> JOB5	Propano	MTBE, TBA	68.75	108.3	nd	nd	nd

+nd (Si se observó degradación pero, No se determinó).

- nd (Si se probó pero, no se observó degradación).

nd, no determinado

2.14.1 Cometabolismo con alcanos

Hardison *et al.* (1997) reportó la degradación cometabólica del MTBE por un hongo del género *Graphium* crecido en dietil éter (DEE) o n-butano. En este trabajo hacen una comparación entre el buen crecimiento demostrado por el hongo crecido con DEE, y el nulo crecimiento demostrado en otros compuestos como 2-etoxietanol, n-propil éter y MTBE, cuando es utilizado como única fuente de carbono y energía. Sin embargo junto con n-butano el micelio que creció fue capaz de degradar MTBE.

Los resultados sugieren que la oxidación inicial de MTBE, y n-alcanos gaseosos es catalizada por la misma enzima, el citocromo P-450 monooxigenasa. Ellos demostraron que la degradación de MTBE ocurre con producción de ter-butil formiato (TBF) que se hidroliza posteriormente para producir TBA.

La máxima tasa de degradación del MTBE por cometabolismo con n-butano fue aproximadamente de $0.88 \text{ mg}_{\text{MTBE}}/\text{g}_{\text{celula}}/\text{h}$ (Tabla 2.4).

Steffan *et al.* (1997) probó varias bacterias propano-oxidantes por su habilidad para degradar MTBE, ETBE, y TAME, especialmente *Mycobacterium vaccae* JOB5 y dos nuevas cepas aisladas de bacterias nocardioformes, ENV421 y ENV425.

La cepa ENV425 degradó MTBE a una tasa de $24.9 \text{ mg}_{\text{MTBE}}/\text{g}_{\text{proteina}}/\text{h}$ y la cepa ENV421 lo degradó a una tasa de $48.58 \text{ mg}_{\text{MTBE}}/\text{g}_{\text{proteina}}/\text{h}$. En el caso del TBA la cepa ENV425 lo degradó a una tasa de $7.1 \text{ mg}_{\text{MTBE}}/\text{g}_{\text{proteina}}/\text{h}$ y la cepa ENV421 a una tasa de $10.7 \text{ mg}_{\text{MTBE}}/\text{g}_{\text{proteina}}/\text{h}$ (Tabla 2.4).

Finalmente, es importante recalcar que, para ambas cepas en una segunda fase mineralizó el TBA hasta CO_2 .

Todas estas bacterias fueron capaces de degradar los tres éteres y TBA después de crecer en varios sustratos sin embargo la tasa de degradación dependió del sustrato utilizado.

La cepa ENV425 crecida en ácido propionico degradó el 100% del TAME. Así mismo la cepa JOB5 que creció en 1-propanol, etanol, o acetona, degradó el 100 % de TAME.

Todas las cepas que crecieron en propano lograron degradar altas tasas de MTBE, ETBE y TBA. El análisis indica que el MTBE y ETBE fueron inicialmente convertidos a TBA y el TAME lo fue a ter-amil alcohol (TAA).

Los resultados de este estudio sugieren que al menos una enzima está involucrada en la degradación de los oxigenantes de la gasolina y que ésta probablemente es una enzima P-450 soluble y que probablemente es una propano monooxigenasa (PMO). Sugieren que esta enzima no se produce cuando los organismos crecen en medios ricos. Este trabajo también demuestra que hay una disminución significativa de la degradación de MTBE y TBA cuando se adiciona al medio un inhibidor (monóxido de carbono o 1-amino benzotriazole (ABT) de la enzima P-450 sugerida.

En otros estudios de la degradación cometabólica del MTBE, como el realizado por Hyman *et al.* (1998) se describe el papel de una monooxigenasa inducida después de crecer en propano con dos cepas la *M. vaccae* JOB5 y en una *Xanthobacter*. Contrario a otros estudios en éste, la oxidación del MTBE por los microorganismos sugiere que el MTBE es inicialmente oxidado a Ter-butil formato (TBF) en una cantidad mayor que a TBA, la oxidación en este estudio fue inhibida por acetileno, pero no por etileno, eso indicó a los autores que el citocromo P-450 tipo monooxigenasa, que en otros reportes inicia la oxidación de propano y MTBE en este caso no se involucró. Se observó que el TBF fue el primer intermediario en la degradación de MTBE después se produjo TBA que posteriormente fue degradado por el mismo proceso cometabólico (Tabla 2.4).

Hyman y O'Reilly (1999) estudiaron en varios microorganismos que utilizan las oxigenasas en sus rutas metabólicas para degradar MTBE. Ellos no observaron una degradación significativa de MTBE en oxidaciones de metano, tolueno, amonio y propileno. Solo se observó degradación de MTBE en microorganismos que tienen la capacidad de crecer en alcanos e isoalcanos gaseosos tal es el caso de *M. vaccae* JOB5. Estos resultados sugieren que la capacidad de crecer en alcanos e isoalcanos es buena para predecir la habilidad de los microorganismos de degradar el MTBE (Fayolle *et al.* 2001). Esta observación es consistente con los resultados de Hardison *et al.* (1997) el cual menciona que *Graphium* sp. fue capaz de crecer en isobutano, propano y n-butano.

Una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, que fue aislada por Garnier *et al.*, (1999) de un suelo contaminado, mostró capacidad para crecer en alcanos más largos como pentano, hexano, heptano como única fuente de carbono y energía. Esta cepa fue capaz de degradar MTBE por cometabolismo, el sustrato más eficiente para la biodegradación de MTBE fue el pentano. Esta cepa mostró acumulación de TBA, sin que fuera posteriormente degradado. Sus resultados también indican una inhibición competitiva entre el pentano y el MTBE, esto sugiere un solo sitio enzimático para los dos compuestos. Pero según sus datos las enzimas involucradas en el proceso de degradación tienen mucha más afinidad por el pentano que por el MTBE (Tabla 2.4). La tasa de remoción de *Pseudomonas aeruginosa* para MTBE fue de $20.6 \text{ mg}_{\text{MTBE}}/\text{g}_{\text{proteína}}/\text{h}$, y para TBA de $4.25 \text{ mg}_{\text{MTBE}}/\text{g}_{\text{proteína}}/\text{h}$. La tasa de crecimiento de la bacteria, fue baja en presencia de MTBE y sin pentano.

Hyman *et al.* (2000) sugirieron que la presencia de alcanos e isoalcanos en acuíferos contaminados con gasolina puede soportar el crecimiento de microorganismos capaces de degradar el MTBE, aunque en sitios contaminados la degradación estaría limitada por el abastecimiento de O_2 . En la evaluación que hacen de una cepa de *Rhodococcus* sp. CT2 con capacidad de crecer en propano, pentano e isobutano les arrojó una tasa de remoción del MTBE más alta con pentano $96.6 \text{ mg}_{\text{MTBE}}/\text{g}_{\text{proteína}}/\text{h}$, seguida de propano e isobutano (Tabla 2.4).

Corcho *et al.*, (2000), evaluaron la habilidad de un cultivo que crece en ciclohexano para metabolizar oxigenantes de la gasolina incluyendo MTBE, TBA, ETBE, DIPE, TAME y compuestos como benceno y tolueno. Este estudio sugiere que la oxidación de MTBE es inducida por un citocromo P-450 monooxigenasa, probablemente una ciclohexano monooxigenasa (CMO). Las tasas de remoción para cada compuesto se presentan en la Tabla 2.4, como se observa la tasa de remoción más alta fue en TAME $9.2 \text{ mg}_{\text{TAME}}/\text{g}_{\text{proteína}}/\text{h}$.

La degradación cometabólica evaluada por Liu *et al.*, (2001), de una cepa de *Arthrobacter* (ATCC 27778) con butano como fuente de carbono, fue de alrededor del 90% de $600 \mu\text{g}/\text{L}$ de MTBE que fue degradado en 30 min con una producción simultánea de TBA, balances de masa indican que el TBA se acumuló en una pequeña cantidad.

La mineralización de MTBE fue confirmada utilizando ^{14}C en ensayos de degradación, en estos todavía se identificó un remanente del 21% de TBA, el cual fue mineralizado después de que todo el MTBE fue degradado.

El reporte menciona la inhibición realizada por acetileno y el propio butano en la degradación de MTBE y TBA, lo cual sugiere que una enzima butano-oxidante es la responsable de la degradación de MTBE y TBA.

En ensayos del efecto de TBA sobre la degradación de MTBE, incrementando la degradación de TBA provocó la inhibición en la degradación de MTBE confirmando la idea de que la misma enzima fue la responsable de la degradación de ambos compuestos con cepas de *Arthrobacter*. La tasa de remoción del MTBE fue de $35.8 \text{ mg}_{\text{MTBE}}/\text{g}_{\text{proteína}}/\text{h}$, asumiendo que el total de la proteína es el 50% de biomasa (Tabla 2.4)

Smith *et al.*, 2003. reportaron que con una cepa de *Mycobacterium vaccae* JOB5 y con propano como fuente de carbono y energía. la máxima tasa de degradación obtenida para MTBE fue $129 \text{ mg}_{\text{MTBE}}/\text{g}_{\text{proteína}}/\text{h}$ y para TBA $46.3 \text{ mg}_{\text{TBA}}/\text{g}_{\text{proteína}}/\text{h}$, en este mismo trabajo se hizo la evaluación de las reacciones iniciales en la oxidación cometabólica del MTBE.

En este reporte se hace mención a la inhibición de que fue objeto, la oxidación de MTBE y la de TBA por el acetileno el cual es reconocido como un inhibidor de la alcano-cadena corta monooxigenasa en *Mycobacterium vaccae* JOB5. Además del acetileno, también el propano inhibió dicha oxidación. Por lo que se dedujo que los primeros pasos en la oxidación del MTBE y TBA con esta bacteria, involucran dos reacciones catalizadas por la misma monooxigenasa.

En estos estudios, el rango de degradación del MTBE estuvo entre $0.88 \text{ mg}_{\text{MTBE}}/\text{g}_{\text{proteína}}/\text{h}$ (Hardison *et al.*, 1997), y $129 \text{ mg}_{\text{MTBE}}/\text{g}_{\text{proteína}}/\text{h}$ (Smith *et al.*, 2003).

2.14.2 Cometabolismo con aromáticos

Existen pocos estudios sobre la degradación cometabólica del MTBE o algún otro oxigenante con compuestos aromáticos, uno de ellos fue el realizado por Deeb y Alvarez-Cohen (2000), donde no se observó degradación de MTBE con dos cepas de *Rhodococcus* sp. que crecieron en tolueno (Fayolle *et al.* 2001).

Independientemente de los estudios de cometabolismo, la presencia de compuestos aromáticos tiene un efecto negativo sobre la capacidad de los microorganismos para degradar MTBE (Fiorenza *et al.*, 2003).

2.14.3 Cometabolismo con alcoholes

Un cultivo de *G. terrae*, IFP 2001 con etanol como sustrato, mineralizó completamente el MTBE con una tasa de degradación de $82.4 \text{ mg}_{\text{MTBE}}/\text{g}_{\text{proteína}}/\text{h}$ (Piveteau 2000).

Con la bacteria IFP 2007 y con etanol como fuente de carbono y energía Hernández-Pérez *et al.*, 2001, logró una tasa máxima de degradación para MTBE de $74 \text{ mg}_{\text{MTBE}}/\text{g}_{\text{proteína}}/\text{h}$, y para TAME de $276 \text{ mg}_{\text{TAME}}/\text{g}_{\text{proteína}}/\text{h}$. La adición de etanol se debió a que se detuvo la degradación cuando estos compuestos se probaron solo como fuente de carbono y energía, al adicionar el alcohol se observó el cometabolismo de esta bacteria en la degradación del MTBE y TAME. La mineralización de estos compuestos no fue completa, pues se observó acumulación de TBA y TAA, sin que se degradara posteriormente. La enzima responsable de la degradación de estos compuestos fue una citocromo P450 monooxigenasa, sin embargo esta bacteria fue incapaz de crecer en alcanos de cadena corta, como butano o propano.

3. Justificación y Objetivos

3.1 Justificación

La revisión hecha anteriormente permitió establecer la problemática ambiental ocasionada por los compuestos oxigenantes de la gasolina. Sin embargo, en México, como en la mayoría de los países subdesarrollados no existe legislación respecto a las emisiones y concentraciones límite del MTBE en aguas subterráneas, que constituye una fuente importante de obtención de agua potable. Tampoco existen estudios que tengan por objetivo evaluar la contaminación de este compuesto. Aunado a lo anterior, en este momento no existe una alternativa económicamente factible que permita la sustitución del MTBE, sin que esta medida tenga un impacto en el precio del combustible. La perspectiva de sustitución de este compuesto en la gasolina no parece viable al menos en el corto plazo. Así la búsqueda de alternativas para el tratamiento de la contaminación constituye motivo de investigación, cuyos resultados deberán estar enfocados a remediar el problema de contaminación ocasionada por la liberación de este compuesto al ambiente. La biorremediación, como una opción de eliminación de este compuesto, ha demostrado ser efectiva para su eliminación. La revisión bibliográfica hecha, muestra que la degradación cometabólica del MTBE es una alternativa viable para la eliminación de dicho compuesto. La búsqueda y caracterización de poblaciones microbianas capaces de degradar este tipo de compuestos constituye la base del éxito de cualquier alternativa biológica de tratamiento. De esta manera, este estudio pretende contribuir al conocimiento que se tiene sobre degradación cometabólica del MTBE y de otros oxigenados de la gasolina, mediante la caracterización de un consorcio microbiano obtenido de sitios contaminados con gasolina de la región sureste de México.

3.2 Objetivos

3.2.1 General

Estudiar la biodegradación por cometabolismo de los éteres oxigenados de la gasolina y algunos intermediarios de su degradación por un consorcio bacteriano obtenido de muestras de suelo contaminadas con gasolina.

3.2.2 Particulares

Caracterización cinética de MTBE, ETBE, TAME, DIPE, TBA y TAA con n-propano, n-butano, n-pentano, n-hexano y n-heptano, para una cierta cantidad del oxigenante variando las concentraciones de los alcanos lineales para:

1. Determinar la máxima tasa de consumo de los alcanos y establecer el o los alcanos más adecuados como sustrato, para el consorcio utilizado en este trabajo.
2. Establecer la influencia en la degradación de los alcanos en presencia de los compuestos oxigenantes.
3. Determinar las tasas de consumo de los oxigenantes, para establecer la influencia en la degradación de cada oxigenante con cada uno de los alcanos y sus concentraciones, y señalar la máxima tasa de degradación de cada uno de los oxigenantes.
4. Determinar los coeficientes cometabólicos para establecer la relación de cometabolismo de los alcanos y los oxigenantes.
5. Obtener los balances de carbono para determinar:
Los rendimientos de biomasa de los alcanos solos y de los alcanos más los oxigenantes. Y la mineralización de los oxigenantes que permita comparar la capacidad de biodegradación del consorcio con los diferentes oxigenantes.

4. Materiales y Métodos

A continuación se describen los materiales y los métodos utilizados en este trabajo.

El sistema experimental en este trabajo está compuesto por:

4.1 Microorganismos (consorcio MI-P)

Los microorganismos utilizados en este estudio forman parte de microorganismos obtenidos de suelos contaminados con gasolina.

A continuación se presenta la tabla que resume las características de identificación de los microorganismos utilizados en este trabajo, la identificación se hizo por secuenciación 16S-rDNA.

Tabla 4.1. Identificación por 16S-rDNA del consorcio MI-P. Morales *et al.*, 2004.

Cepas identificadas	Identificación por secuenciación	Identidad (%)	Pares de bases
IMP-P1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AF193514	99	1402
IMP-P2	<i>Pseudomonas</i> sp. Cepa no cultivable clona:OSIL-17	99	1036/1037
IMP-P3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Y16139	99	1055/1059

Como puede apreciarse en la Tabla 4.1 el consorcio se compone de tres cepas del género *Pseudomonas*, dos especies de *aeruginosa*, y una *Pseudomonas* sp.

4.2 Medio Mineral (MM)

Fue un medio mineral simple, conteniendo los elementos básicos, N, P, Mg y elementos traza. La composición se muestra en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2 Composición del medio mineral Fortín y Deshusses (1999).

Compuesto	Concentración (g/L)	Elementos traza	
		Compuesto	Concentración (g/L)
K ₂ HPO ₄	2	HCl	6.76 mL
KH ₂ PO ₄	1	FeCl ₂	1.59
CaCl ₂	0.018	H ₃ BO ₃	0.06
NH ₄ Cl	0.75	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.1
MgSO ₄	0.5	COCl ₂ ·6H ₂ O	0.12
Elementos traza	1 (ml/L)	ZnCl ₂	0.07
Ph	7.0	NiCl ₂ ·2H ₂ O	0.025
		CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.015
		NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.025
		EDTA (Na ₂ CH ₂ O) ₄	5.2
		H ₂ O bidestilada	Para disolver y aforar
		NaOH	Necesario
		Ph	4.2

4.3 Propagación de Microorganismos

Antes de ser utilizados como inóculos del sistema experimental, los microorganismos fueron propagados en un reactor de procultivo (con aproximadamente 2 litros de capacidad), adicionando un litro de Medio Mineral (Tabla 4.2), 400 uL de pentano y 200 uL de MTBE, dos veces por semana y cambiando el MM una vez por semana, para ello la biomasa se centrifugó en tubos Falcón® de 50 mL de capacidad, por 30 min. a 10,000 RPM y temperatura de 20°C, para posteriormente re-suspender la biomasa en medio fresco, y preparar nuevamente el pre-inóculo. Al menos una vez al mes se retiró la mitad de la biomasa para renovar la edad del cultivo.

4.3.1 Inóculo

Cuando las condiciones del pre-inóculo eran las adecuadas se preparaba el inóculo, para montar los microcosmos.

Se tomó la población microbiana directamente del reactor de procultivo, se lavaron las células, se resuspendieron en Medio mineral (Tabla 4.2) fresco, se cuantificó la proteína

por el método de Coomassie (Ver apéndice B), para posteriormente inocular los microcosmos.

4.4 Microcosmos

Los análisis cinéticos de degradación de los oxigenados utilizados fueron realizados, en microcosmos, usando botellas serológicas de 125 mL, con 20 mL de MM e inoculando en cada botella 20 mg/L de proteína.

En el caso de las cinéticas con n-pentano, n-hexano y n-heptano como sustrato, las botellas fueron selladas con válvulas Mininert[®] de teflón, en aquellas en las que se utilizó como sustrato a n-butano y n-propano se sellaron con tapones de vitón engargolados con aros de aluminio.

Las cinéticas realizadas se dividieron en unidades experimentales, cuatro unidades por cinética, cada una con las siguientes condiciones:

Ejemplo de unidad experimental

Microcosmos (repeticiones)	Oxigenante	Oxigenante adicionado (mg/C)	N-alcano adicionado
3	MTBE	1	n
2	ETBE	1	n
3	TAME	1	n
2	DIPE	1	n
2	TBA	1	n
2	TAA	1	n
2	n-alcano	0	n

Donde: n = 0.5, 1, 2 y 4 mg de n-alcano por cada una de las cuatro unidades experimentales.

Para las unidades sólo se variaba la concentración del n-alcano adicionado, es decir se tenían cuatro unidades experimentales con una concentración constante de 1 mg aproximadamente del oxigenante, y una concentración variable de 0.5, 1, 2 y 4 mg (ver columna n-alcano como ejemplo) del n-alcano en turno.

Los oxigenantes, así como los n-alcanos líquidos fueron adicionados con una jeringa (Agilent[®]) con capacidad de 10 µL.

Los n-alcanos gaseosos se adicionaron con jeringas Plastipak^{MR} de 1 y 3 mL.

4.5 Reactivos

Metil ter-butil éter (98%, $\rho=0.740$ g/mL), Etil ter-Butil éter (99%, $\rho=0.742$ g/mL), ter-Amil Metil éter (97%, $\rho=0.770$ g/mL), di-Isopropil éter(99% $\rho=0.718$ g/mL), ter-Butil alcohol (99%, $\rho=0.77$ g/mL), ter-Amil alcohol (99%, $\rho=0.805$ g/mL), todos de Aldrich® Chemicals. Pentano (99%, $\rho=0.626$ g/mL), Hexano (99%, $\rho=$), Heptano (99%, $\rho=0.68$), todos de J.T. Baker.

n-Propano (99%), n-Butano(99%) ambos de Matheson tri-gas, Alltech associates.

Albumina bovina (96%) Sigma.

4.6 Análisis

4.6.1 Cromatográficos

Fase gas

Hidrocarburos

El análisis de concentraciones de los compuestos en fase gas, se realizó en cromatografía de gases FID (flame ionization detector), en un cromatógrafo Hewlett Packard HP 6890, con columna capilar, de Metil Sillicón de 30m y diámetro de 320 μm , y película de 0.25 μm , con un flujo constante de 1.5 mL/min, con presión de 7.22 psi y velocidad de 26 cm/seg, las condiciones de trabajo fueron temperatura de la columna 40°C, temperatura del detector 250°C, temperatura del inyector 180°C, flujo de hidrógeno de 30 mL/min, flujo de aire de 300 mL/min, y el gas acarreador de la muestra fue helio.

Este análisis se realizó tomando periódicamente (dependiendo de la velocidad de la degradación) muestras de 100 μL de la fase gaseosa del frasco (head space) con una jeringa para gases (Pressure-Lok®, Baton Rouge, Luisiana) de 0.250 mL de capacidad.

Bióxido de carbono, oxígeno

El oxígeno y bióxido de carbono, se analizaron en un cromatógrafo de gases Gow Mac (serie 580), con una columna Alltech CTR1 (concéntrica de 6' X 1/4" exterior y 6' X 118" interior) y detector de conductividad térmica, el gas utilizado para acarrear la muestra fue el Helio, con un flujo de 60mL/min. Las condiciones de operación fueron: columna 40°C,

detector 115°C, inyector 50°C y el detector de corriente 125 mA. Este análisis se realizó tomando muestras de 500 µL cada 24 horas con una jeringa estéril Plastipack® de 1 mL.

Fase líquida

Oxigenados

El análisis de concentraciones de los compuestos en fase líquida, se realizó en un cromatógrafo Hewlett Packard HP 6890, con columna capilar, modelo Alltech AT1000 de 60m y diámetro de 250 µm, y película de 0.25 µm, especial para analizar muestras acuosas con un flujo constante de 1.0 mL/min, con presión de 24.01 psi y velocidad de 22 cm/seg, las condiciones de trabajo fueron temperatura de la columna 110°C, temperatura del detector 275°C, temperatura del inyector 180°C flujo de hidrógeno de 30 mL/min, flujo de aire de 300 mL/min, y el gas acarreador de la muestra fue helio 25 mL/min. El monitoreo se realizó tomando periódicamente (cada 24 h.) muestras con una jeringa estéril de 1 mL Plastipak^{MR}, 200µL de la fase líquida. La muestra fue colocada en un vial de 1.5 mL conteniendo en su interior un inserto de vidrio de 200µL, para posteriormente colocarlos en el automuestreador y analizarlos por cromatografía de gases FID,

Curvas estándar

Los estándares para cuantificar la concentración de los compuestos tanto en fase gas como en líquida se realizaron mediante la adición de cantidades conocidas y crecientes de todos los oxigenantes y alcanos en un volumen conocido, estos se analizaron por cromatografía. Los datos del área bajo la curva integrada por el cromatógrafo y la concentración del compuesto añadido siguieron una relación lineal, realizando una curva estándar por medio de una regresión lineal, transformado de volumen adicionado a concentración del compuesto (Ver apéndice A).

4.6.2 Proteína

La proteína fue medida como un estimado de masa celular, además de estandarizar la biomasa inicial de todos los experimentos. En este trabajo se utilizaron dos técnicas: 1). Coomassie (Sedmark *et al.*, 1977) y 2). Lowry (Lowry *et al.*, 1951), para la cuantificación de proteína inicial y final respectivamente, Coomassie fue sustituida en la cuantificación final, por Lowry. Los dos métodos se describen detalladamente en el Apéndice B.

4.7 Cálculos realizados

4.7.1 Tasas de consumo

Los datos de degradación de los compuestos se ajustaron mediante el modelo de Gompertz. Este modelo fue desarrollado por Benjamín Gompertz en 1825, se basa en una función matemática con una doble exponencial.

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

Donde: Y es la cantidad de sustrato consumido, α representa la máxima cantidad de sustrato consumida (mg de sustrato/ microcosmos), β es el incremento en el consumo del sustrato cuando el tiempo se incrementa, k es la velocidad de consumo del sustrato, relacionada con x que es el tiempo.

A partir de la ecuación de Gompertz se determina el valor de la velocidad máxima (V_{\max}), considerada la velocidad máxima de consumo de sustrato, ésta se calcula derivando la cantidad de sustrato consumido (Y), con respecto del tiempo (x). Así el valor resultante es una constante $V_{\max} = 0.368\alpha k$

La velocidad máxima de consumo de sustrato se expresa en este trabajo en mg de sustrato consumido/g de proteína/h. En este trabajo se hace la relación por g de proteína pues se determinó experimentalmente la proteína en los microcosmos.

- Antes de usar el modelo de Gompertz para modelar los datos experimentales, es necesario estimar en cada tiempo experimental la cantidad de sustrato consumido (SC) mediante el cálculo:

$$SC = (S_i - S_e)$$

Donde:

SC, Sustrato consumido

S_i , Cantidad inicial del sustrato en cada microcosmos

S_e , Cantidad de sustrato, en un tiempo definido.

Para poder realizar este ajuste de los datos experimentales con el modelo de Gompertz, se utilizó el programa Kaleida Graph™, versión 3.08 de Sinergy Software.

4.7.2 Coeficiente cometabólico

El coeficiente cometabólico (CC) se define como la masa del compuesto cometabolizado por unidad de masa de sustrato degradado, en este trabajo es utilizado para cuantificar el cometabolismo de los compuestos utilizados en presencia de un sustrato.

La máxima cantidad de degradación de cada compuesto puede calcularse con el parámetro de ajuste α del modelo de Gompertz.

$$CC = [\alpha (O) / \alpha (C)] [\text{mg (O)} / \text{mg (C)}]$$

Donde:

O, oxigenante

C, n-alcano

4.7.3. Balances de carbono

Para establecer el destino de las diferentes fuentes de carbono se analizaron muestras en fase gas y en fase líquida, para cuantificar la concentración de los alcanos y oxigenantes así como los intermediarios TBA y TAA.

Adicionalmente se cuantificaron el CO₂ y la producción de biomasa (CH_{1.8}, N_{0.2}, O_{0.5}) determinada indirectamente por proteína.

Para la determinación de biomasa generada para cada uno de los sustratos se estableció la relación entre el resultado experimental en la cuantificación de la proteína y la cantidad de compuesto consumido (mg de carbono), considerando que aproximadamente el 50% es producción de biomasa.

En todos los casos el balance se hizo considerando el carbono consumido, tanto del alcano como del oxigenante tomando en cuenta solo la fracción de carbono presente en las moléculas. La fórmula general utilizada fue:



5. Resultados

El consorcio MI-P utilizado en este trabajo constituido de microorganismos identificados como tres especies del género *Pseudomonas*, fue probado con n-alcanos de cadena corta (C3-C7) además de los oxigenantes como los éteres MTBE, TAME, ETBE, DIPE y los alcoholes TBA y TAA. El análisis obtenido a partir de los resultados experimentales se presenta a continuación.

El orden de este capítulo está estructurado para analizar en primer lugar el desarrollo completo de la cinética de pentano y MTBE, mostrando a manera de ejemplo la evolución del consumo de pentano, MTBE, y producción de CO₂ para una de las condiciones ensayadas. Posteriormente se presentan los resultados de la degradación de todos los oxigenantes probados con pentano en todas las condiciones ensayadas, analizando además, el CO₂ producido, oxígeno consumido y biomasa producida.

Por último se presenta el análisis de los resultados obtenidos de la degradación de todos los n-alcanos probados como fuente de carbono y energía, seguida del análisis de todos los oxigenantes con los alcanos restantes y finalmente los balances de carbono para cada una de las diferentes condiciones.

5.1 Cinética de pentano

A continuación se muestran los resultados de esta cinética con todas las condiciones ensayadas con este alcano, se presentan primero por ser el punto de partida de la fase experimental pues fueron las condiciones iniciales a las que se tenía adaptado el consorcio MI-P (pentano y MTBE).

5.1.1 Desarrollo de la cinética de Pentano y MTBE

Para este experimento se agregaron 2 mg C provenientes del pentano y 1 mg C del MTBE.

En la Fig. 5.1 se presenta la serie de gráficas del desarrollo de esta cinética, ésta es la representación gráfica del comportamiento general mostrado por el consorcio MI-P.

La gráfica 5.1a. muestra la evolución en la cantidad de pentano a lo largo de la cinética. Se observa que éste se empezó a degradar de forma inmediata y la remoción completa se observó en un período de 30 h.

En la gráfica 5.1b. se aprecia la remoción de MTBE 1 mg C, y se observa que la degradación del oxigenante se inicia inmediatamente, así mismo se muestra que aproximadamente a las 30 h, cuando el pentano ya había sido completamente consumido por el consorcio, el oxigenante fue degradado en un 50% alcanzándose su completa degradación a las 100 h. Es importante señalar la aparición de TBA como producto intermediario de la degradación del MTBE (gráfica 5.1c).

La tercera de esta serie es la gráfica 5.1d. donde se presenta la producción de CO_2 como resultado de la degradación completa de MTBE y pentano. Se observa que la generación de CO_2 fue constante aún después de que se degradó completamente el alcano y los oxigenantes (MTBE y TBA intermediario) la generación posterior de CO_2 , puede ser un indicativo de la lisis celular o de una incorporación lenta del carbono por parte del consorcio MI-P.

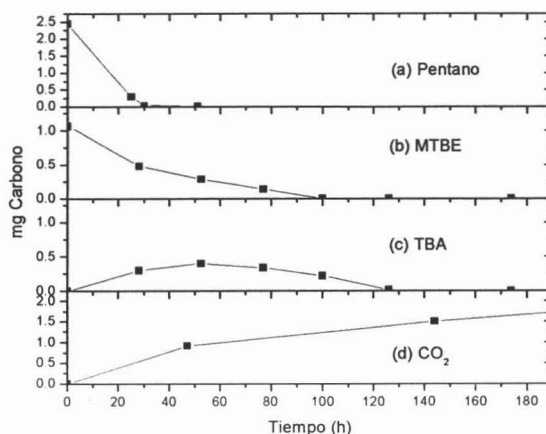


Figura 5.1 Desarrollo cinético de pentano y MTBE, a. Consumo de pentano, b. Consumo de pentano más MTBE, c. Producción y consumo de TBA intermediario, d. Producción de CO₂

Posteriormente se hizo una comparación de las tasas de consumo donde la cantidad de pentano se varió entre 0.5 y 5 mg de C y con una cantidad fija de MTBE (1 mg C), haciendo paralelamente un experimento sólo con pentano. Este experimento se realizó con el fin de establecer si la presencia de MTBE originaba algún tipo de retraso en la degradación del pentano.

5.1.2 Tasas de degradación del pentano en presencia de MTBE

En la Fig. 5.2 se pueden observar las tasas de degradación obtenidas para el pentano en los experimentos donde se ensayó pentano solo y mezclas con diferentes cantidades de pentano (0.5 y 5 mg C) y MTBE (1 mg C).

En el rango de 0.5 a 3 mg C de pentano no se observa una diferencia entre las tasas de degradación.

Con esta consideración al analizar todos los resultados obtenidos en la degradación del pentano se observó que, para todos los casos, no hubo diferencia significativa entre las tasas de consumo del pentano solo y de pentano más MTBE, y cuando a este alcan

además se le adicionó cualquiera de los otros oxigenantes. Esto sugiere que las enzimas responsables de la degradación no compiten por un mismo sustrato, y probablemente esto se deba a sitios enzimáticos diferentes para cada compuesto.

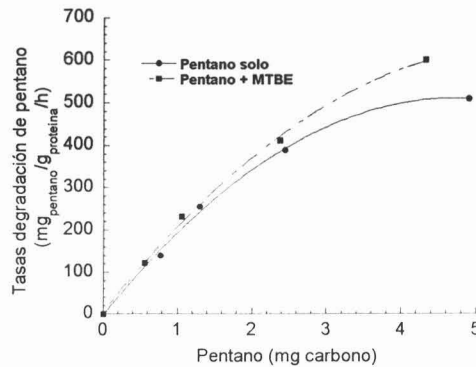


Figura 5.2 Tasas de degradación de pentano solo y de pentano más MTBE.

Previamente se han presentado los resultados obtenidos para pentano y MTBE, una serie de la cinética de pentano, estos resultados pretenden ilustrar como fue el desarrollo de la cinética de pentano, mientras que, los microorganismos consumían el alcano y el MTBE. Además de hacer notar cuál fue el efecto observado en el consumo de pentano solo y en presencia de MTBE.

Hasta aquí se han presentado los resultados obtenidos de la degradación de MTBE con pentano. A continuación se presentan los resultados obtenidos para evaluar la capacidad del consorcio de degradar los demás oxigenantes. Además de analizar la influencia de los alcanos en la degradación de los oxigenantes, y determinar la concentración más adecuada de alcano para su completa mineralización.

5.1.3 Tasas de degradación de los oxigenantes en la serie de cinéticas con pentano

En la Fig. 5.3 se presentan las velocidades de consumo de cada uno de los oxigenantes en presencia de concentraciones variables de pentano y se muestra la habilidad del consorcio MI-P para degradar oxigenantes en presencia de este alcano. Esta gráfica es el resultado del análisis cuando la cantidad de pentano adicionada se varió entre 0.5 y 5 mg C y 1 mg C de cada uno de los oxigenantes, y se presenta en función de los mg C del

alcano y las tasas máximas de consumo de los oxigenantes, las tasas se reportan en mg oxigenante consumido/g proteína/h.

Todos los oxigenantes probados pudieron degradarse por el consorcio y requirieron por arriba de 1 mg C de pentano para degradar 2 mg de C provenientes de los diferentes oxigenantes. Las tasas máximas de degradación obtenidas bajo estas condiciones fueron **76, 72, 86, y 33 mg oxigenante/g proteína/h** de MTBE, TAME, ETBE y DIPE, respectivamente y **104 y 57 mg oxigenante/g proteína/h** para TAA y TBA, respectivamente.

De acuerdo a las tasas de degradación de los oxigenantes que en esta serie de cinéticas fueron totalmente mineralizados, se observó que el MTBE, el ETBE y el TAME tuvieron una tasa mayor que el DIPE, esto sugiere una especialización por parte del consorcio MIP para degradar el enlace éter. En el caso de TBA y TAA la capacidad de este consorcio para mineralizar ambos oxigenantes fue probada con éxito obteniendo una tasa de degradación alta para TAA.

Adicionalmente se puede observar en la Fig. 5.3 que las tasas de degradación del TBA fueron menores que para el MTBE y el ETBE lo que explica por que en las cinéticas se observó la acumulación temporal de TBA. Por el contrario el TAA intermediario en la degradación del TAME tuvo una tasa de degradación más alta a la de éste último, y no se observó acumulación.

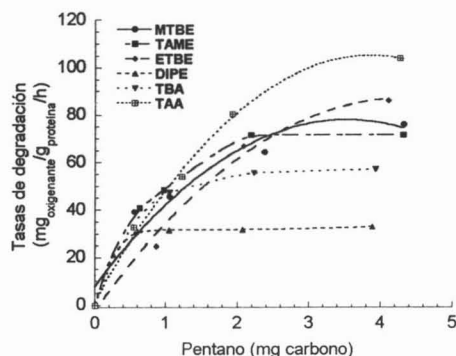


Figura 5.3. Tasas de degradación de los oxigenantes en presencia de pentano.

Con el propósito de establecer el grado de mineralización de los oxigenantes se cuantificaron las principales fuentes de carbono, así a continuación se presentan los resultados obtenidos de la producción de CO_2 , el consumo de O_2 y la producción de biomasa.

5.1.4 Producción de CO_2 en las cinéticas de pentano en presencia de oxigenantes.

La finalidad de este análisis fue comprobar la existencia de diferencias en los niveles de CO_2 producidos en los diferentes experimentos con pentano solo y en series con este alcano más el oxigenante en turno, la diferencia marcará el grado de mineralización del oxigenante.

En todas las gráficas de la Fig. 5.4 se observa que la producción de CO_2 siempre fue mayor en los experimentos con los oxigenantes. Así mismo, en esta serie de gráficas se observa la producción de CO_2 del pentano más el oxigenante, en concentraciones variables del alcano y 1 mg C del oxigenante, en MTBE la máxima cantidad de CO_2 producida fue de 2.7 (gráfica a), TAME 3.7 (gráfica b), ETBE y DIPE 3 (gráfica c y d respectivamente), TBA 2.9 (gráfica e), y TAA 2.2 (gráfica f). todos en mg de C de CO_2 .

La diferencia en mg de C de CO_2 producido con pentano solo y de pentano más el oxigenante es variable (MTBE 0.55, TAME 1.6, ETBE 0.91, TBA 0.76, TAA 0.12 y DIPE 0.99). mg de carbono de CO_2 , esta diferencia señala la mineralización del oxigenante.

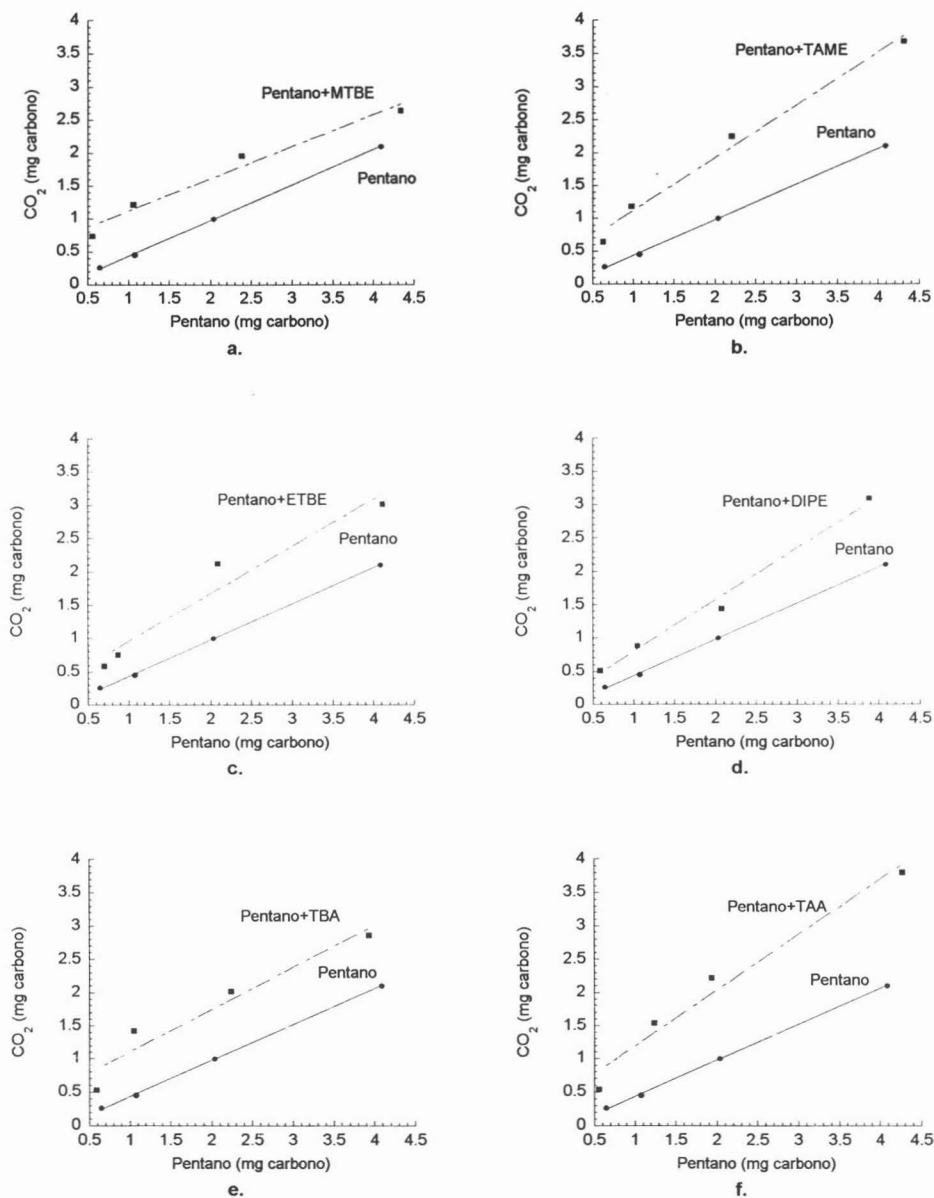


Figura 5.4. Producción de CO₂ de las cinéticas de pentano con diferentes oxigenantes.

5.1.5 Consumo de O₂ en las cinéticas de pentano en presencia de oxigenantes.

Asociado a la degradación de las diferentes fuentes de carbono hay consumo de O₂. En la Fig. 5.5 se muestran los resultados del consumo de O₂ con pentano solo y los del consumo de O₂ del pentano más el oxigenante. Como se observa, hay una diferencia evidente entre ambos lo cual indica una mayor actividad celular en los resultados donde los oxigenantes estuvieron presentes, resaltando un mayor consumo de este gas para TAME y TAA.

En la serie de cinéticas de pentano más oxigenante la máxima cantidad de O₂ consumido fue 11 mg en MTBE (gráfica a), 13 mg TAME y ETBE (gráficas b, y c respectivamente), 9.7 mg DIPE (gráfica d), 11.4 mg TBA (gráfica e), y 9 mg TAA (gráfica f). Así mismo para ETBE y DIPE se observó que a concentraciones menores del alcano el consumo de oxígeno por parte del consorcio es muy similar al observado cuando se adicionó solo pentano. Se observa claramente que la diferencia en el consumo de O₂ se debió a la degradación de los oxigenantes.

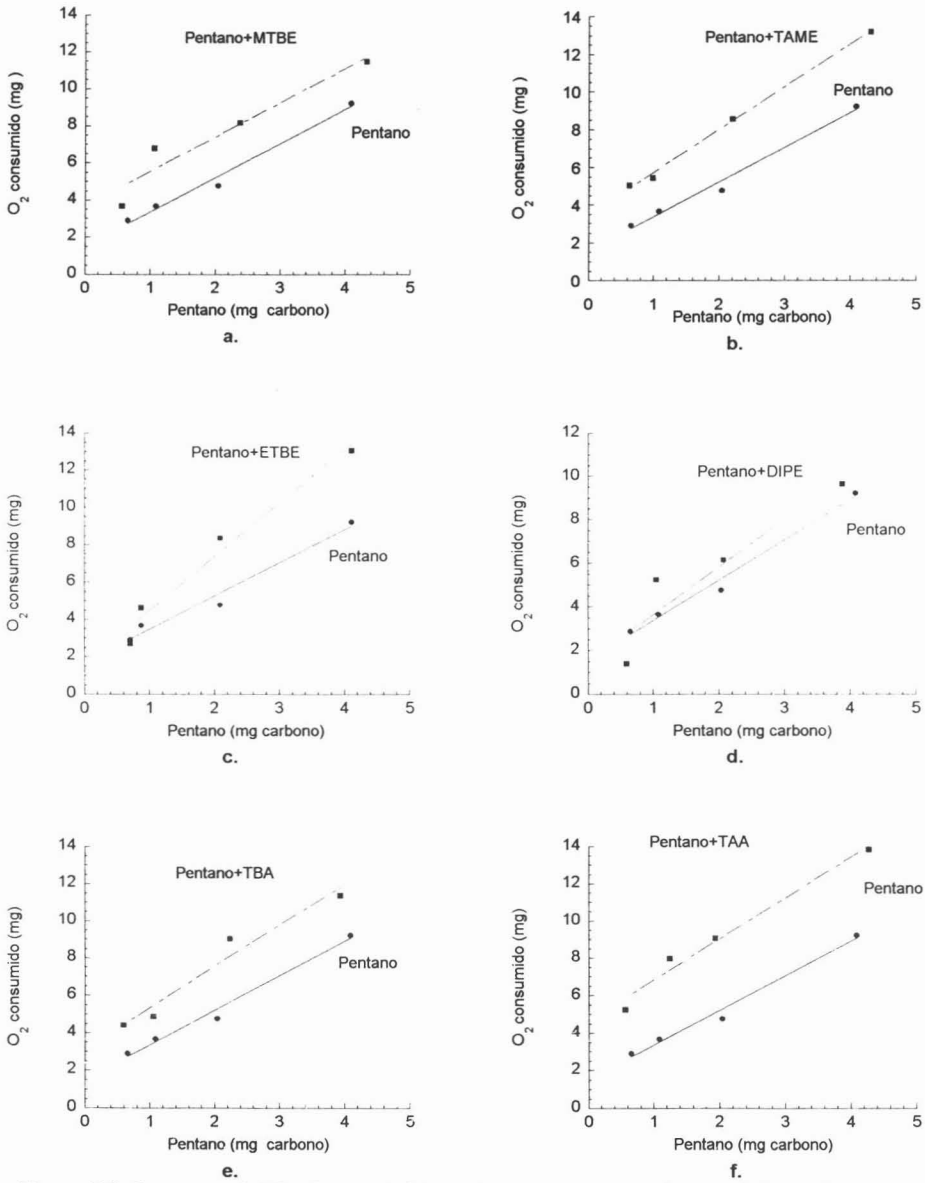


Figura 5.5. Consumo del O₂ de las cinéticas de pentano con cada uno de los oxigenantes.

5.1.6 Producción de biomasa en las cinéticas de pentano en presencia de oxigenantes.

Por último en la Fig. 5.6 se presentan los resultados de la producción de biomasa de los diferentes experimentos, como se puede observar no existen diferencias, con lo que se demuestra que los oxigenantes no intervienen en la formación de biomasa, es decir que no son utilizadas por los microorganismos como fuente de carbono para sus procesos anabólicos. La producción de biomasa es la misma cuando se adicionó pentano solo que cuando se adicionó pentano más oxigenante.

En resumen el consorcio MI-P fue capaz de degradar todos los éteres y alcoholes, además de demostrar la mineralización completa de los mismos, ningún oxigenante mostró tener algún efecto en la degradación del pentano o en la producción de biomasa.

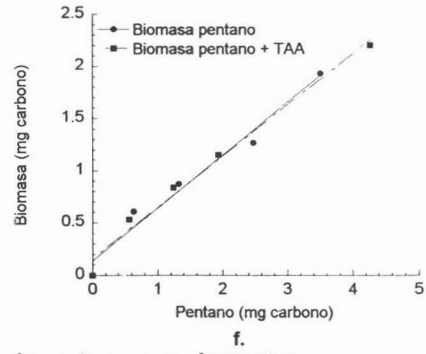
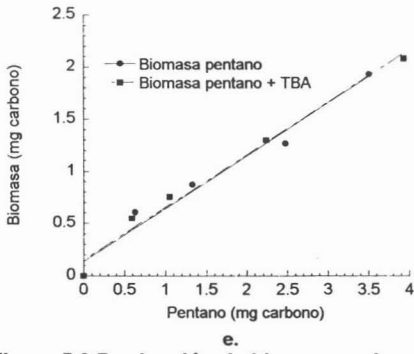
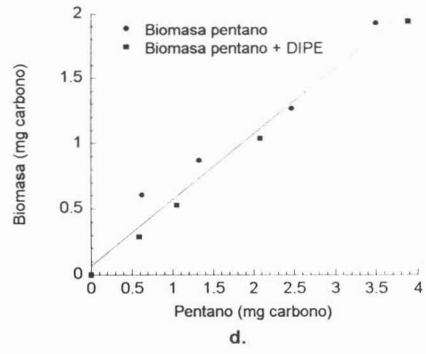
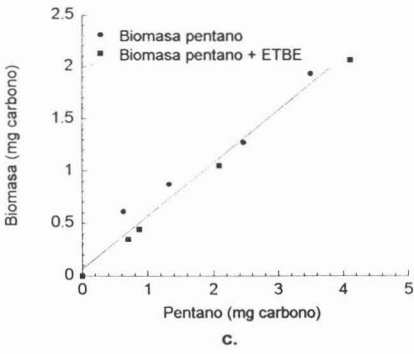
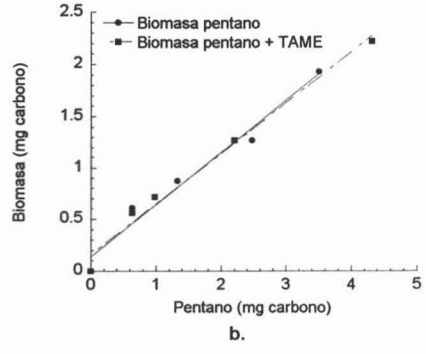
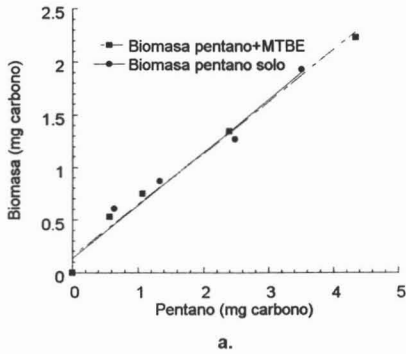


Figura 5.6 Producción de biomasa en las cinéticas de pentano con oxigenantes.

5.2 Otros alcanos

5.2.1 Parámetros cinéticos y distribución de la fuente de carbono en las cinéticas de degradación de los n-alcanos.

La capacidad del consorcio MI-P de degradar n-alcanos como fuente de carbono y energía se muestra en la Fig. 5.7 donde se aprecian las tasas de degradación de los cinco n-alcanos probados, cada uno de estos en una concentración inicial entre (0.5, 1, 2, y 4 mg de carbono por microcosmos). La utilización fue completa con cada uno de los alcanos por parte de este consorcio MI-P, la tasa de degradación más alta se observó en hexano (896 mg/g proteína/h), seguido de heptano (849.2 mg/g proteína/h), pentano (508.7 mg/g proteína/h), propano (388.6 mg/g proteína/h), y butano (289.1 mg/g proteína/h).

En los balances de carbono (Apéndice D) la recuperación de carbono como CO₂ en promedio fue más elevado en heptano, hexano y butano (88, 72 y 75 % carbono), le siguieron propano y pentano (52 y 45 % carbono). El rendimiento de biomasa en promedio fue menor en heptano y hexano (alrededor del 30%) aproximadamente el 50% para propano y los rendimientos más altos se presentaron en butano y pentano arriba de 67% (Apéndice D).

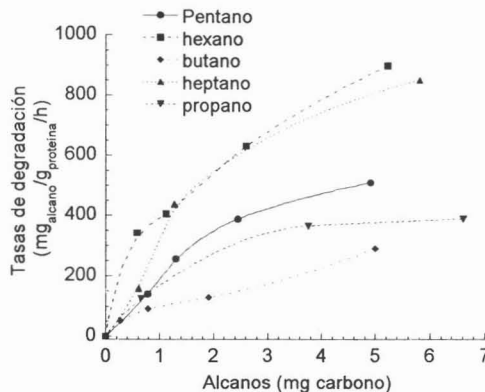
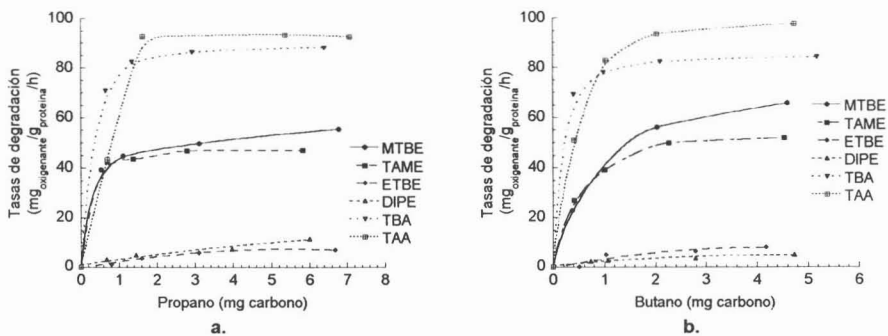


Figura 5.7 Tasas de degradación de los n-alcanos probados

5.2.2 Tasas de degradación de los diferentes oxigenantes en presencia de propano, butano, hexano y heptano.

En Fig. 5.8 se resumen las velocidades de consumo de cada uno de los oxigenantes en presencia de concentraciones variables de propano, butano, hexano, y heptano. Estas cinéticas muestran la máxima tasa de degradación de cada uno de los oxigenantes con los alcanos antes mencionados, comparando en las gráficas las tasas de degradación se observa claramente como se comportó el consorcio MI-P con cada uno de los alcanos para llegar a la degradación completa de los éteres y alcoholes.

En el caso del MTBE, TAME, ETBE y DIPE la máxima tasa de degradación se observó en la cinética de hexano (gráfica c) con una degradación de **71.5 mg_{MTBE}/g_{proteína}/h** de MTBE, TAME de **59.5 mg_{TAME}/g_{proteína}/h**, ETBE **37 mg_{ETBE}/g_{proteína}/h**, DIPE **28 mg_{DIPE}/g_{proteína}/h**, haciendo notar que en el caso de las cinéticas de ETBE y DIPE estos no fueron totalmente consumidos. Por otro lado en el caso de los alcoholes las máximas tasas de degradación se observaron en la cinética de propano para el TBA **88 mg_{TBA}/g_{proteína}/h** (gráfica a), y en la cinética de butano para el TAA **97.5 mg_{TAA}/g_{proteína}/h**. (gráfica b).



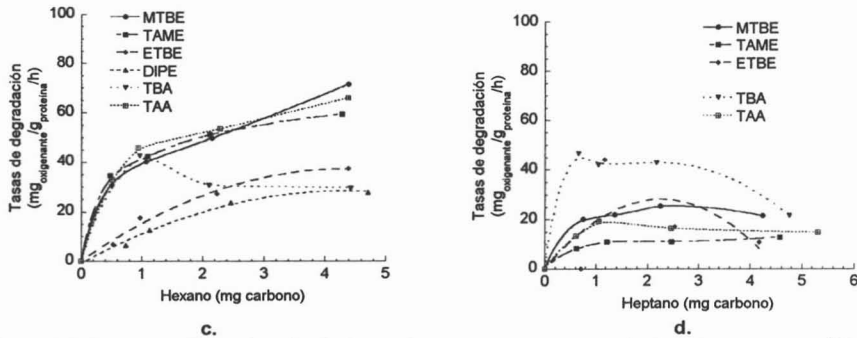


Figura 5.8 Tasas de degradación de los oxigenantes en presencia de alcanos específicos: a. Propano, b. Butano, c. Hexano, d. Heptano. (con excepción de DIPE en heptano por no disponer de datos)

5.3 Análisis general de la distribución de la fuente de Carbono.

En esta sección se presenta los balances de balance de carbono de los alcanos y los oxigenantes utilizados en este trabajo (el análisis de los balances completos se presenta en el Apéndice D). En este análisis se corroboró la incorporación de carbono de los n-alcanos y los oxigenantes por parte de los microorganismos del consorcio MI-P a su metabolismo, ya sea para mineralizarlos completamente hasta CO_2 o para utilizarlos directamente en su crecimiento y reproducción (formación de biomasa); determinando el grado de mineralización de los oxigenantes, y el rendimiento hacia biomasa.

En la Tabla 5.1 se encuentran resumidos los datos que indican como fue la distribución de carbono en cada cinética. Se presentan los datos en promedio de la recuperación de carbono tanto del CO_2 , como de la biomasa (los datos de los balances completos se presentan en el apéndice D).

Es importante señalar que se logró evaluar casi todas las fuentes de carbono y que como puede observarse en la Tabla 5.1 y en el Apéndice D, estos balances de carbono en recuperación global cerraron en su mayoría por arriba del 90%.

El análisis se realizó por oxigenante del balance hecho para la cinética con MTBE (Tabla 5.1 y Apéndice D) se observa que la mayor recuperación de carbono en forma de CO_2 se obtuvo para la realizada con hexano seguida de heptano, y estas cinéticas fueron de

forma consistente también las que tuvieron un menor rendimiento de biomasa. Cuando se compararon las fuentes de carbono para TAME (Tabla 5.1, Apéndice D) se observó esta misma tendencia de comportamiento en hexano y heptano.

En las cinéticas de propano y butano, en promedio la recuperación de carbono como CO₂ fue menor que en las cinéticas de hexano y heptano, sobre todo en MTBE y TAME, pero el rendimiento de biomasa fue menor en las segundas (Tabla 5.1). Con la cinética de pentano la diferencia observada en recuperación de carbono fue menos evidente en ambos oxigenantes, ya que la recuperación de carbono en forma de CO₂ y biomasa fue cercana a 50% en cada caso.

La cantidad de alcano necesaria para la degradación completa de MTBE (1 mg C) varió según el alcano desde 2.75 mg de carbono de propano a 1.06 mg C de pentano o hexano, y sin embargo de entre estos dos alcanos la eficiencia cometabólica fue mayor en pentano (Tabla 5.1). Por otro lado para degradar la misma cantidad de TAME, la cantidad de alcano necesaria fue menor en casi todos los casos, pero el más eficiente fue el pentano por ser éste el que en menor proporción se necesitó (0.98 mg C de pentano) para degradar 1 mg C de TAME y se corroboró al tener un coeficiente metabólico alto (1.31). Por estos resultados se consideró al pentano el alcano más eficiente para el cometabolismo de estos dos oxigenantes.

En el análisis de los éteres DIPE y ETBE la cantidad de carbono recuperado como CO₂ en promedio fue de arriba de un 50%, en los datos de rendimiento de biomasa se presentó un menor rendimiento en hexano y heptano alrededor del 19% aumentando hasta aproximadamente el 40% para propano y butano, en pentano este rendimiento fue de alrededor del 30% (Tabla 5.1). Por otro lado el conjunto de datos mostró una capacidad limitada por parte del consorcio MI-P para degradar alrededor de 1 mg C de estos oxigenantes en presencia de los alcanos probados, sólo para pentano se observó la degradación completa cuando se agregó 2.1 y 3.9 mg C de pentano para ETBE y DIPE respectivamente (Tabla 5.1 y Apéndice D). En ambos casos el coeficiente cometabólico es bajo (ETBE 0.53 y DIPE 0.34) en comparación con observados en la Tabla 5.1 para los demás oxigenantes.

Comparando los datos del TBA y TAA en presencia de los n-alcános se obtuvo una recuperaci3n de carbono como CO₂ arriba del 50% (Tabla 5.1 y Ap3ndice D). Al igual que en los 3teres el mayor rendimiento se observ3 en hexano y heptano. En ambos alcoholes el rendimiento de biomasa fue mayor en pentano, y siguiendo con la tendencia de los 3teres, menor para hexano y heptano. Por otro lado, la menor cantidad de alcáno necesaria para degradar TBA, se observ3 en hexano, heptano y propano (0.51, 0.66, y 0.66 mg C, respectivamente) y para degradar 1 mg C de TAA la menor cantidad se observ3 en butano y hexano (0.42 y 0.51 mg C), y sin embargo el coeficiente cometaol3ico m3s elevado result3 ser el del propano para TBA (1.93) y el butano (2.79) para TAA.

Cabe hacer la aclaraci3n que el consorcio MI-P fue capaz de mineralizar completamente el MTBE, TAME, TBA, y TAA, cuando 2 mg C de cualquier alcáno fue adicionado. Con excepci3n de TAME y TAA con heptano, donde la degradaci3n de ambos no fue completa. As3 mismo el consorcio fue capaz de mineralizar completamente el ETBE y el DIPE solo con pentano y cuando este estuvo presente en 2 y 4 mg C respectivamente (Ap3ndice D).

Tabla 5.1 Balance de carbono para los diferentes experimentos con alcanos y oxigenantes.

Alcano	Recuperación de carbono como CO ₂	Recuperación de carbono como biomasa (oxigenante +alcano)	Recuperación global de carbono CO ₂ y biomasa	Cantidad de alcano necesaria para la degradación completa del oxigenante (mg carbono)	Coefficiente Cometabólico (mg de oxigenante/mg de alcano)
MTBE					
Propano	0.65	0.33	0.98	2.75	0.380
Butano	0.64	0.39	1.0	1.65	0.399
Pentano	0.57	0.41	0.98	1.06	1.162
Hexano	0.8	0.2	1.0	1.06	1.092
Heptano	0.79	0.16	0.95	2.25	0.476
TAME					
Propano	0.65	0.33	0.98	1.37	1.02
Butano	0.65	0.28	0.93	1.01	1.56
Pentano	0.53	0.39	0.92	0.98	1.31
Hexano	0.85	0.15	1.0	2.13	0.57
Heptano	0.85	0.17	1.0	1.21**	0.51
TBA					
Propano	0.63	0.32	0.95	0.66	1.93
Butano	0.71	0.25	0.96	0.99	1.29
Pentano	0.61	0.44	1.0	1.05	1.22
Hexano	0.76	0.16	0.92	0.51	1.40
Heptano	0.80	0.15	0.95	0.66	1.82
TAA					
Propano	0.61	0.33	0.94	0.70	2.24
Butano	0.62	0.38	1.0	0.42	2.79
Pentano	0.63	0.41	1.0	1.24	0.92
Hexano	0.78	0.20	0.98	0.51	2.74
Heptano	0.77	0.18	0.95	1.06**	1.61
ETBE					
Propano	0.45	0.44	0.89	*	*
Butano	0.69	0.39	0.98	4.17**	0.18
Pentano	0.59	0.33	0.92	2.09	0.53
Hexano	0.79	0.20	0.99	4.38**	*
Heptano	0.79	0.17	0.96	*	*
DIPE					
Propano	0.52	0.42	0.94	*	*
Butano	0.48	0.42	0.90	*	*
Pentano	0.59	0.41	1.0	3.88	0.34
Hexano	0.74	0.22	0.96	*	*
Heptano	0.71	0.20	0.91	*	*

* no degrada

**no degrada completamente, valor más cercano

6. Discusión

La degradación de oxigenantes por cometabolismo mediante el uso de alcanos de cadena corta ha sido reportada en algunos trabajos, la mayor parte enfocados a MTBE, sin embargo en la mayoría de estos la degradación de los oxigenantes es incompleta o limitada.

En trabajos donde el género *Pseudomonas* fue utilizada para degradar éteres se reportan los siguientes resultados: Steffan *et al.*, 1997, reportó a *Pseudomonas* sp. CAM capaz de crecer en alcanfor la cual degradó $2.1 \text{ mg}_{\text{MTBE}}/\text{g}_{\text{proteína}}/\text{h}$ de MTBE, Garnier *et al.*, 1999, con *P. aeruginosa* creciendo en pentano, reporta una tasa de degradación de $20.6 \text{ mg}_{\text{MTBE}}/\text{g}_{\text{proteína}}/\text{h}$ de MTBE. Otro trabajo de cometabolismo con 2-metil pentano es el reportado por Hyman *et al.*, 1999, con la cepa *P. Mendocina*, la cual degradó $21.1 \text{ mg}_{\text{MTBE}}/\text{g}_{\text{proteína}}/\text{h}$ de MTBE, en este trabajo como en los anteriores hubo acumulación de TBA, sin que posteriormente este alcohol se degradara. Con el consorcio MI-P en MTBE se obtuvo una tasa de degradación de $76 \text{ mg}_{\text{MTBE}}/\text{g}_{\text{proteína}}/\text{h}$ y una mineralización completa del oxigenante con pentano (Fig.5.2), de todos los alcanos probados en este trabajo es también con pentano con el que se observó el mejor coeficiente cometabólico.

El TAME es otro de los éteres donde el cometabolismo ha sido probado de manera restringida, entre los pocos trabajos encontrados resalta uno donde la bacteria involucrada es *Gordonia terrae* IFP 2007, por su alta tasa de remoción, este trabajo fue el realizado por Hernandez-Perez *et al.*, 2001 (Tabla 5). En el presente trabajo la tasa de remoción más alta se observó en pentano (Fig. 5.2) además de una mineralización completa con este alcano y con casi todos los demás probados. Sin embargo el mejor coeficiente cometabólico se registró con butano (Tabla 5), convirtiendo a este alcano en una opción muy buena para la degradación cometabólica del TAME

La capacidad del consorcio para degradar ETBE y DIPE se mostró limitada, ya que en casi todos los alcanos probados estos éteres no se consumieron o solo se consumieron parcialmente. Con una tasa de degradación buena el ETBE en la cinética de pentano (Fig. 5) se mostró como la línea más prometedora, así mismo sucedió con el DIPE con una tasa de degradación más baja pero también prometedora. Los estudios de degradación cometabólica de estos dos éteres son reducidos, los avances para la degradación de

ETBE se reportan en algunos trabajos como el de Steffan *et al.*, 1997, que con las bacterias *Nocardia* sp. ENV425, *Nocardia* sp. ENV421, y *Mycobacterium vaccae* JOB5, se reportó degradación cometabólica positiva con propano, sin embargo no se determinó la cantidad o la velocidad del éter degradado. Un nuevo trabajo realizado por Corcho *et al.*, 2000 con un cultivo de bacterias ciclohexano-oxidantes determinó una tasa de degradación para el ETBE de $1.91 \text{ mg}_{\text{ETBE}}/\text{g}_{\text{proteína}}/\text{h}$ y para DIPE de $1.36 \text{ mg}_{\text{DIPE}}/\text{g}_{\text{proteína}}/\text{h}$.

Estos valores demuestran que la tasa de degradación y el grado de mineralización obtenidos en este trabajo con pentano y ambos éteres son buenos, a pesar de que, los trabajos anteriormente referidos no se realizaron con bacterias del género *Pseudomonas*.

En este trabajo con el consorcio MI-P, las mejores tasas de degradación, y los coeficientes cometabólicos de los éteres se obtuvieron con pentano (Fig.5).

Hay pocos trabajos con reportes de degradación por cometabolismo de TBA y TAA utilizando bacterias del género *Pseudomonas*, sin embargo uno importante es el realizado por Garnier *et al.*, 1999 que reporta una tasa de degradación para TBA con pentano de $4.25 \text{ mg}_{\text{TBA}}/\text{g}_{\text{proteína}}/\text{h}$.

Cuando el consorcio MI-P se probó con TBA y TAA las mejores tasas de degradación fueron obtenidas con propano $88.1 \text{ mg}_{\text{TBA}}/\text{g}_{\text{proteína}}/\text{h}$ (Fig. 5.7, gráfica a), para el primero, y para el segundo con butano $97.5 \text{ mg}_{\text{TAA}}/\text{g}_{\text{proteína}}/\text{h}$ (Fig. 5.7, gráfica b), ambas obtenidas con menos de 0.70 mg de carbono de alcano, por lo que sus coeficientes cometabólicos son altos (Tabla 5.1). Así mismo es importante señalar que en presencia todos los n-alcanos probados el consorcio MI-P fue capaz de degradar ambos alcoholes y la mineralización fue completa también en ambos.

Los mejores resultados de tasas de degradación y coeficiente cometabólico se registraron con propano para TBA y con butano para TAA, haciendo de estos alcanos los más prometedores para trabajos de cometabolismo con estos oxigenantes.

Finalmente en este trabajo se lograron cuantificar casi todas las fuentes de carbono. En general el rendimiento de biomasa fue menor en las cinéticas de hexano y heptano con los oxigenantes, sin embargo la diferencia observada en el rendimiento con los otros alcanos no es excesiva, el mejor rendimiento de biomasa está determinado en pentano,

este rendimiento se refleja en las cinéticas conjuntas de pentano con MTBE, TAME, TBA, y TAA, lo que es razonable si se toma en cuenta que el consorcio MI-P fue adaptado a crecer en pentano más MTBE por un período prolongado.

En las cinéticas de degradación de oxigenantes en presencia de los n-alcanos la remoción completa o parcial de los oxigenantes hacen evidente, que para este consorcio MI-P hay varios alcanos con posibilidades de ser utilizados cometabólicamente (como fuente alterna de carbono y energía) para la degradación completa de oxigenantes específicos.

En la mayoría de los trabajos consultados se hace referencia a la capacidad enzimática expresada por los microorganismos para degradar los oxigenantes, pero en pocos se hacen conclusiones respecto a la enzima responsable.

De acuerdo a los resultados se podría pensar en la actividad de una monooxigenasa por los trabajos que anteceden a éste, en cometabolismo con alcanos. Muchas observaciones sugieren que la enzima responsable de la primera reacción que lleva a la oxidación del MTBE es una alcano-monooxigenasa, la cual también inicia con la oxidación del alcano (Garnier *et al.*, 1999, Hyman *et al.*, 2000, Liu *et al.*, 2001, Smith *et al.*, 2003), a estas observaciones se suman las que se hicieron en este trabajo como son:

La inmediata actividad de oxidación de los alcanos probados y de los oxigenantes, en todos los casos no se observó diferencia significativa entre las tasas de consumo de los n-alcanos solos y las tasas de consumo de los n-alcanos con cada uno de los oxigenantes indicando que la o las enzimas no compiten por el sustrato.

Hubo además diferencias en la actividad de oxidación, entre cada uno de los éteres, esto se hizo más evidente cuando los resultados indicaron un limitado consumo de ETBE y DIPE, lo cual sugirió que el ataque principal de la alcano-monooxigenasa de los microorganismos que componen el consorcio MI-P es la unión metil-oxígeno común en el MTBE y el TAME, pero no presente en el ETBE y DIPE.

En todos los trabajos donde se detectó acumulación de TBA, se sugiere que el paso limitante para la completa mineralización del MTBE es el carbón terciario. En este trabajo

se observó que para este consorcio los alcoholes no fueron problema. Así se sugiere que para el consorcio MI-P la enzima responsable de la degradación de TBA y MTBE además de los n-alcanos fue la misma. En este sentido hay resultados indicando que la oxidación del TBA se llevó a cabo por parte de la enzima que también es responsable de la oxidación del MTBE y del alcano en cuestión (Smith *et al.*, 2003), ya en trabajos anteriores daban cabida a esta posibilidad (Steffan *et al.*, 1997, Garnier *et al.*, 1999, Liu *et al.*, 2001).

7. Conclusiones

A lo largo de las dos últimas décadas se han desarrollado numerosos estudios, que sugieren viabilidad en la biodegradación de los oxigenantes, los que contrariamente en reportes iniciales se consideraban recalcitrantes. Sin embargo cultivos puros y mixtos de bacterias y hongos han demostrado capacidad para degradar parcial o totalmente a estos sobre todo al MTBE, ya sea como única fuente de carbono y energía o cometabólicamente por cultivos que crecieron en alguna fuente de carbono alterna.

Los resultados de los trabajos revisados, reiteradamente han abordado la relevancia del estudio y desarrollo de estrategias en biorremediación como la mejor opción con aplicación en el tratamiento de acuíferos contaminados con oxigenantes. Es entonces que, el conocimiento recabado a través del tiempo en estos trabajos, brinda la información necesaria acerca de la identificación de las limitaciones que pueden impedir la aplicación exitosa de bioprocesos de remoción de oxigenantes del ambiente. Algunas de estas imitaciones son: la capacidad reducida por parte de los microorganismos para mineralizar completamente los oxigenantes, además de necesidad de contar con un inóculo grande que se pudiese aplicar en campo.

Así, los microorganismos que degradan compuestos oxigenantes y que lo utilizan como única fuente de carbono y energía, a pesar de tener tasas específicas de consumo alta, tienen una tasa de crecimiento baja con un largo período de proliferación celular (en ocasiones de meses) lo cual constituye la principal limitante para ser utilizados exitosamente en la biorremediación.

Los resultados obtenidos en este estudio dejan ver las ventajas del uso de un alcano de cadena corta como fuente de carbono alterna para reducir tal limitación y que pueda impedir el éxito de la remoción completa y efectiva de contaminantes tales como MTBE, TAME, ETBE, DIPE, TAA y TBA.

De acuerdo a estos resultados el cometabolismo constituye una alternativa viable para la eliminación de los compuestos oxigenantes, ya que los microorganismos se reproducen rápidamente, además de tasas específicas de consumo altas para los oxigenantes, y la mineralización completa de MTBE, TAME, TBA, TAA, ETBE y limitadamente DIPE.

Concordantemente las tasas de degradación obtenidas en este trabajo con bacterias *Pseudomonas* son más altas del rango que se reportan en la literatura, sobre todo para MTBE, TAME y sus intermediarios TBA y TAA. Y por tanto los resultados de este trabajo respaldan el potencial mostrado por este consorcio como una alternativa exitosa en biorremediación.

En estudios futuros existe la posibilidad de considerar la oxidación por parte del consorcio MI-P de otros compuestos con uniones éter, considerados recalcitrantes. Por lo que se proponen estudios más detallados por oxigenante que permitan tener una visión más amplia del desarrollo de los procesos cometabólicos entre oxigenantes y alcanos de cadena corta. Además, de un estudio del tratamiento en laboratorio de aguas contaminadas con oxigenantes, seguido de una prueba piloto en campo que pueda proveer de los datos necesarios para crear un sistema exitoso de remoción completa de los oxigenantes *in situ*.

En la actualidad los compuestos que son utilizados en procesos de producción son introducidos al ambiente, sin hacer estudios o tener en cuenta los efectos, y daños posteriores que estos puedan causar, es importante señalar que este tipo de estudios no son prioridad para ningún país, independientemente del desarrollo económico. Un ejemplo de este error se hace evidente en los oxigenantes, ya que aunque la atención se ha enfocado en el MTBE, la NAWQA de EE. UU. enfatiza que este oxigenante es sólo un químico de muchos otros detectados en aguas subterráneas, y que muchos de estos químicos son igual o más riesgosos que el MTBE para la salud humana y el ambiente. Por lo tanto se propone en la medida de lo posible un estudio más detallado de los químicos que son utilizados o que están por utilizarse en los procesos industriales en México, así como de sus posibles implicaciones a la salud y al ambiente.

Bibliografía

1. Bauman B. (1999) What's in Gas? Or Gasoline, Yesterday and Today a 20th Century Miracle: A look at maddeningly complex world of gasoline formulation and Distribution. EPAoust National Conference. In www.epa.gov/ehs/epaoust.htm.
2. Buenrostro C., Dovalí A. (2001). Estudio para la determinación y evaluación del metil terbutil éter (MTBE). *DGCOH*, oficio GDF-SOS/01-523.
3. Corcho D., Watkinson R., Lerner D. (2000). Cometabolic degradation of MTBE by a ciclohexane-oxidizing bacteria. In *Wickramanayake G.B., Gavaskar A., Alleman B., Magar V. (eds) Bioremediation and phytoremediation of chlorinated and recalcitrant compounds. Batelle Press Columbus Ohio. 183-189.*
4. Cowan R., Park K. (1996). Biodegradation of the gasoline oxygenates MTBE, ETBE, TAME, TBA, and TAA by aerobic mixed cultures. In Fiorenza S., Rifai H. (2003). Review of MTBE Biodegradation and Bioremediation. *Bioremediation Journal. 7(1):1-35.*
5. Deeb R., Alvarez-Cohen. (2000). Aerobic biotransformation of gasoline aromatics in multicomponent mixture. *Bioremediation journal. (4):171-179.*
6. Dupasquier D., Revah, S., Auria R.,. (2002). Biofiltration of Methyl Tert-Butyl Ether Vapors by Cometabolism with Pentane: Modeling and Experimental Approach. *Environmental Science Technology. (36):247-253.*
7. Eweis B., Watanabe N., Schroeder D. Chang D., Scow M. (1998). MTBE biodegradation in the presence of other gasoline components. In Fiorenza S., Rifai H. (2003). Review of MTBE Biodegradation and Bioremediation. *Bioremediation Journal. 7(1):1-35.*
8. Faulk R., Gray J. (2001) Salem Revisited: Updating the MTBE Controversy. *Environmental Forensic. (2):29-59.*
9. Favela (2000) comunicación personal.

10. Fayolle F., Vandecasteele J.-P., Monot F. (2001). Microbial degradation and fate in the environment of methyl tert-butyl ether and related fuel oxygenates. *Applied Microbiology Biotechnology*. 56: 339-349.
11. Fiorenza S., Rifai H. (2003). Review of MTBE Biodegradation and Bioremediation. *Bioremediation Journal*. 7(1):1-35.
12. Fortin N., Deshusses M. (1999). Treatment of Methyl tert-butyl ether vapors in biotrickling filters 1. Reactor start up, steady state performance and culture characteristics. *Environmental Science Technology*. (33):2980-2986.
13. Francois A., Mathis H., Godefroy D., Piveteau P., Françoise Fayolle., Monot F. (2002). Biodegradation of Methyl tert-Butyl Ether and Other Fuel Oxygenates by a New Strain, *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012. *Applied and Environmental Microbiology*. (68):2754-2762.
14. Franklin PM, Koshland CP, Lucas D, Sawyer RF. (2000). Clearing the air: using scientific information to regulate reformulated fuels. *Environmental Science Technology*. (34):3857-3863.
15. Fujiwara Y., Kinoshita T., Sato H., Kojima I. (1984). Biodegradation and Bioconcentration of Alkyl Ethers. *Yukagaku*. (33):111-114.
16. Garnier P., Auria R., Augur C., Revah S. (1999). Cometabolic biodegradation of methyl t-butyl ether by *Pseudomonas aeruginosa* grown on pentane. *Applied Microbiology. Biotechnology* (51):498-503.
17. González R., Leyva M. (2001). "Prospectivas de uso de compuestos oxigenados en la formulación de Gasolinas " *VIII Foro de avances en la Industria de la Refinación organizado por el Instituto Mexicano del Petróleo. 11 y 12 de Septiembre 2001*. IMP.
18. Hanson J., Ackerman C., Scow K., (1999). Biodegradation of methyl tert-butyl ether by a bacterial pure culture. *Applied and Environmental Microbiology*. (65):79-84.

19. Hardison L., Curry S., Ciuffetti L., Hyman M. (1997). Metabolism of Diethyl Ether and Cometabolism of Methyl ter-Butyl Ether by Filamentous Fungus, a *Graphium* sp. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(8):3059-3067.
20. Hatzinger P., McClay K., Vainberg S., Tugusheva M., Condee C., Steffan R. (2001). Biodegradation of Methyl tert-Butyl ether by a Pure Bacterial Culture. *Applied and Environmental Microbiology*. (67):5601-5607.
21. Hernández-Pérez G., Fayolle F., Vandecasteele J. (2001). Biodegradation of ethyl t-butyl ether (ETBE), methyl t-butyl ether (MTBE) and t-amyl methyl ether (TAME) by *Gordonia terrae*. *Applied and Environmental Biotechnology*. (55):117-121.
22. Hyman M., Musafika-Jeknic T., Kwon P., Williamson K., O'Reilly K. (1998). Cometabolism of MTBE by Alkane-Utilizing Microorganisms. *Cevron Bioteam*. (178):8-12.
23. Hyman M., O'Reilly K. (1999). Cometabolic degradation of MTBE by iso-alkane utilizing bacteria from gasoline-impacted soils. In *Wickramanayake G.B. Batelle*, Columbus Ohio. 149-155.
24. Hyman, M., Taylor C., O'Reilly K. (2000). Cometabolic degradation of MTBE by iso-alkane utilizing bacteria from gasoline-impacted soils. *Bioremediation*. 149-155.
25. Hyman M., Smith C., O'Reilly K. (2001). Cometabolism of MTBE by aromatic hydrocarbon-oxidizing bacteria. In *Wickramanayake G.B., Gavaskar A., Alleman B., Magar V. (eds) Bioremediation and phytoremediation of chlorinated and recalcitrant compounds. Batelle Press* Columbus Ohio. 145-152.
26. Iturber., Flores R., Torres L. (2003). Soil and water contamination levels in an out-of-service oil distribution and storage station in Michoacan, Mexico. *Water and Soil Pollution*. (14):261-281.
27. Jacobs J., Guertin J., Herron C. (2001). *MTBE: Effects on Soil and Groundwater Resources*. Lewis Pub. N.Y. 243 pp.

28. Johnson R., Pankow J., Bender D., Price C., Zogorsky J. (2000). " To what extent will past releases contaminate community water supply wells?". *Environmental Science Technology*. (32):210-217.
29. Kane S., Beller H., Legler T., Koester C., Pinkart H., Halden R., Happel A. (2001). Aerobic Biodegradation of methyl tert-butyl ether by aquifer bacteria from leaking underground storage tank sites. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(12):5824-5829.
30. Keller A., Sandall C., Rinker R., Mitani M., Bierwagen B., Snodgrass J. (2001). Cost and performance evaluation of treatment technologies for MTBE-Contaminated water. http://www.tsrtp.ucdavis.edu/mtbertp/vol5_3.pdf.
31. Kharoune M., Kharoune L., Lebault J., Pauss A. (2002). Aerobic Degradation of Ethyl-tert-Butyl Ether by a Microbial Consortium: Selection and evaluation of Biodegradation Ability. *Environmental Toxicology Chemical*. 21(10):2052-2058.
32. Liu C., Speitel G., Georgiou G. (2001). Kinetics of Metil t-Butyl Ether Cometabolism at Low Concentrations by Pure Cultures of Butane-Degrading Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. (67):2197-2201.
33. Lowry O., Rosenbrough N., Farr L., Randall R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. Department of Pharmacology, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri.
34. Manzanares L., Muñoz L., Romero C., Nevarez V., Ramirez E., Delgado M., Keer A. (2001). Monitoring of MTBE as ambient air pollutant in service station in Chihuahua City. In *Proceedings of the 94th Annual Conference and Exhibition of the Air and Waste Management Association*. P. 689. Orlando, Florida (June 24-28).
35. Mo K., Lora A., Wanken A., Kulpa F. (1995). Biodegradation of methyl t-butyl ether by pure bacterial cultures. *Abstract, 95th ASM General Meeting*. (95):408. in Fiorenza, S., Rifai, H. (2003). Review of MTBE Biodegradation and Bioremediation. *Bioremediation Journal*. 7(1):1-35.

36. Morales M., Velázquez E., Jan J., Revah S., González U., Razo E. (2004). Methyl tert-Butyl Ether Biodegradation by Microbial Consortia Obtained from Soil Samples of Gasoline Polluted Sites in Mexico. *Biotechnology Letters* 26: p. 269-275.
37. Piveteau P., Fayolle F., Le Penru Y., Monot F. (2000). Biodegradation of MTBE by cometabolism in laboratory-scale fermentations. In *Wickramanayake G.B., Gavaskar A., Alleman B., Magar V. (eds) Bioremediation and phytoremediation of chlorinated and recalcitrant compounds. Batelle Press Columbus Ohio.* 141-148.
38. PEMEX, Heredia-Velázquez A. (2000). Evolución de las gasolinas automotrices en PEMEX a partir de la expropiación petrolera www.franquiciapemex.com/octanaje/que.htm
39. PEMEX, Memoria de labores (2001). *PEMEX refinación.* p. 3, 8, 51, 77.
40. Prince R. (2000). Biodegradation of Methyl tertiary-Butyl Ether (MTBE) and Others Fuel Oxygenates. *Critical Reviews in Microbiology.* 26(3):163-178.
41. Reich M. S. (1994). Top 50 chemicals production rose modestly last year. *Chemical. Eng. News* (72):12-16.
42. Reyna G., Vega E., Reyes E., Múgica V., Chow V., Watson J., Arriaga J. (2001). Importance of determining volatile organic compounds source profiles to diminish ozone concentrations in Mexico City metropolitan area. *Proceedings of the 94th Annual Conference and Exhibition of the Air and Waste Management Association.* Paper 921. Orlando, Florida (June 24-28).
43. Salanitro P., Diaz A., Williams P., Wisniewski L. (1994). Isolation of a bacterial culture that degrades methyl ter-butyl ether. *Applied and Environmental Microbiology.* 60(7):2593-2596.
44. Schifter I., Díaz L. Guzmán E. (2000). La Tecnología en los vehículos y las gasolinas Pemex Magna y Pemex Premium. *Revista Octanaje Pemex.* (25).
45. Schifter I.; Díaz L.; Avalos S.; Vera M.; Barrera A.; López S. E. (2000a). Effect of Methyl Tertiary Butyl Ether Concentrations on Exhaust Emissions from Gasoline

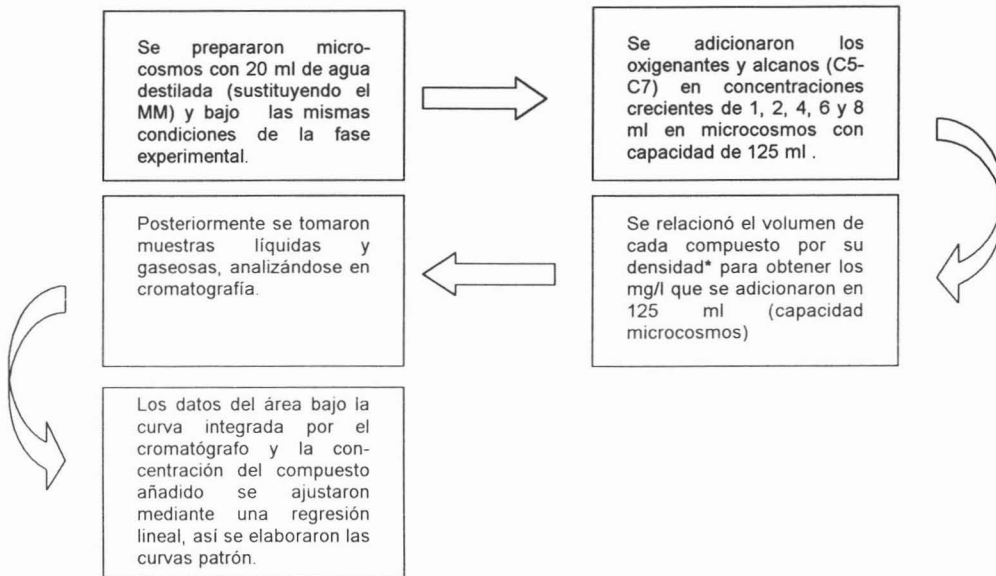
- Used in the Metropolitan Area of Mexico City. *Journal of the Air and Waste Management Association*. (50):488-494.
46. Schifter I., Díaz L., Vera M., Castillo M., Ramos F., Avalos S., Lopez-Salinas E. (2001). Impact of Engine Technology on the Vehicular Emissions in Mexico City. *Environmental Science Technology*. (34):2663-2667.
47. Secretaría de Energía (SENER). (2002). *Anuario estadístico petroquímica 2001*. México. 246-248.
48. Sedmark J., Grossberg E. (1977). A rapid sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G250. *Analytical Biochemistry*. (79):544-552.
49. Sedran M., Pruden A., Wilson G., Suidan T., Venosa A. (2002). Effect of BTEX on Degradation of MTBE and TBA by Mixed Bacterial Consortium. *Journal Environmental Engine*. 128(9):830-835.
50. Smith C., O' Relly K., Hyman M. (2003). Characterization of the initial Reactions during the Cometabolic Oxidation of Methyl tert-Butyl Ether by Propane-Grown *Mycobacterium vaccae* JOB5. *Applied and Environmental Microbiology*. (69):2. 796-804.
51. Squillace J., Pankow F., Korte E., Zogorski S. (1997). Review of the Environmental Behavior and Fate of Methyl tert-Butyl Ether. *Environmental Toxicology Chemical*. (16):1836-1844.
52. Steffan R.J., McClay K., Vainberg S., Condee W., Zhang D. (1997). Biodegradation of the Gasoline Oxygenates Methyl ter-Butyl Ether, Ethyl ter-Butyl Ether, and ter-Amil Methyl Ether by Propane-Oxidizing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. (63):4216-4222.
53. Stocking J.A., Deeb R., Flores A. Stringfellow W., Talley J., Brownell R., Kavanaugh C.. (2000). Bioremediation of MTBE: a review from a practical perspective. *Biodegradation* 11:187-201.
54. Suflita J., Mormile R. (1994). Anaerobic biodegradation of known and potential gasoline oxygenates in the terrestrial subsurface. *Environmental Science Technology*. (27):976-978.
-

55. Torck B. (1999). A look at oxygenated fuels. *Oil Gas Science Technology* 77-80.
56. USEPA Environmental Protection Agency. (1994). Health risk perspective on fuel oxygenates. U. S. Environmental Protection Agency. EPA 600/R94/217. <http://www.epa.gov/ncea/pdfs>.
57. USEPA Environmental Protection Agency. (1995). How to evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for corrective Action Plan. www.epa.gov/ncea/swerust1/p_pdf.
58. USEPA Environmental Protection Agency. (1998). Oxygenates in Water: Critical Information and Research Needs. Office of Research and Development. EPA/600/R-98/048. www.epa.gov/ncea/pdfs/oxy_h2o.pdf.
59. USEPA Environmental Protection Agency. (2000). 40 CFR Part 755. Methyl Tertiary Butyl ether (MTBE): Advance Notice of Intent to Initiate Rulemaking Under the Toxic Substances Control Act to Eliminate or Limit the Use of MTBE as a Fuel Additive in Gasoline. pp. 16094-16109, *Federal Register*, (65):58.
60. Vautrain JH. (1999). California refiners anticipate broad effects of possible state MTBE ban. *Oil Gas Journal* Jan (18):18-22.
61. Wilson G., Pruden A., Suidan T., Venosa A. (2002). Biodegradation kinetics of MTBE in laboratory batch and continuous flow reactors. *Journal Environmental Engine*. 128(9):824-829..
62. Woodward D., Sloan, D. (2001). Common myths, misconceptions and Assumptions about MTBE: ¿Where are we now?. *AEHS Soil sediment & water. Special issue*. 16-19.
63. Zambrano A., De Vizcaya A. Uribe R., Salazar L., Pérez B., Arriaga J.L. Zapata I., García J. L., González U., Calderón E. S., Cebrián M.E. (2002). Toxicity of Mexican gasoline vehicle emissions. 12th CRC ON-ROAD Vehicle Emissions Workshop. San Diego.. April 15-17.

Apéndice A. Curvas Estándar

A.1 Elaboración de curvas

Los estándares para transformar el volumen de compuesto adicionado (gas o líquido), a concentraciones de mg/l se realizaron como sigue:



La curva estándar para calcular la cantidad de CO_2 producido se calculó en base a una mezcla de gases, la cual se inyectó en cromatografía en cantidades conocidas y crecientes (1, 2, 3, 4, 5, 10 y 20 ml de mezcla), de donde posteriormente se separó el porcentaje de CO_2 correspondiente, utilizando la ley general de los gases para calcular los mg de CO_2 en cada punto.

La cantidad de O_2 consumida se calculó en base al porcentaje obtenido de cada muestra de aire después de analizarse en cromatografía, utilizando la ecuación general de los gases, y extrapolando posteriormente para determinar el consumo de oxígeno de cada microcosmos.

A continuación se presentan las curvas estándar en fase gas y en fase líquida de todos los compuestos utilizados en este trabajo.

* En el caso de propano y butano la conversión de volumen adicionado a mg/l, se realizó primero calculando la molaridad del alcano, y después su concentración (mg), para finalmente obtener la concentración adicionada en 125 ml (capacidad del microcosmos) en mg/l.

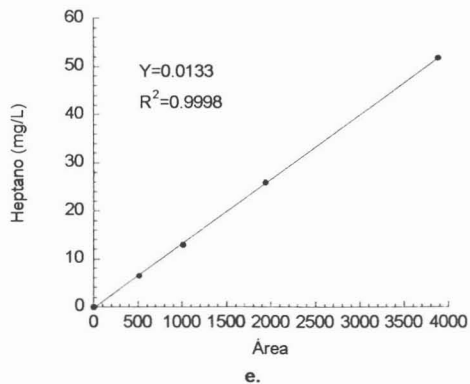
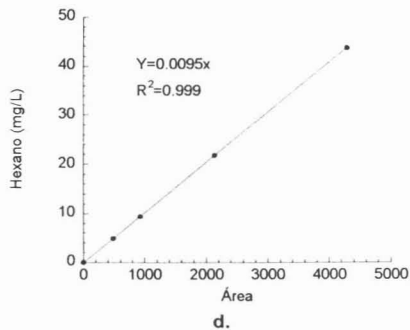
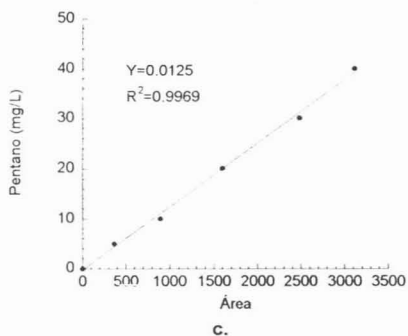
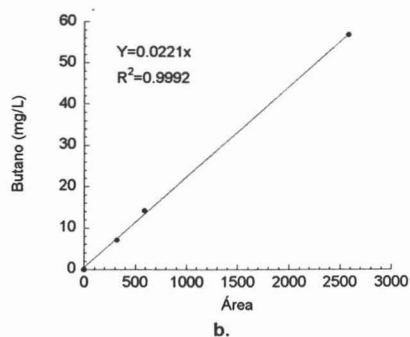
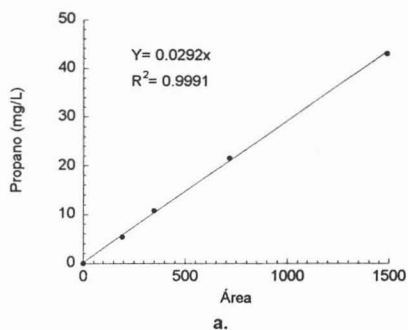
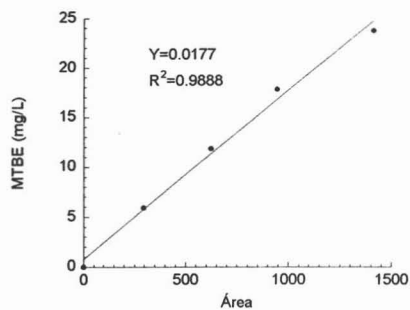
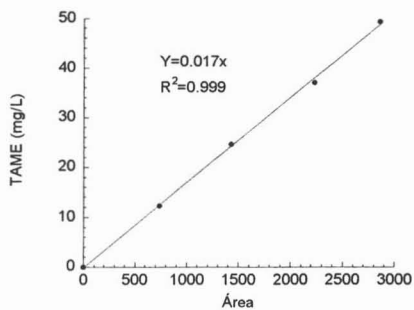


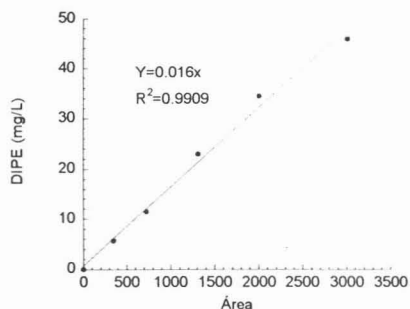
Figura. A-I Curvas estándar de los alcanos en fase gas



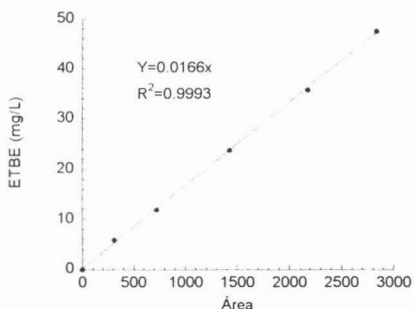
a.



b.



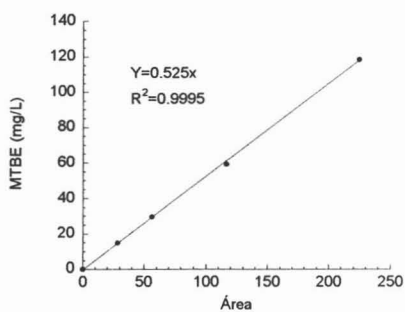
c.



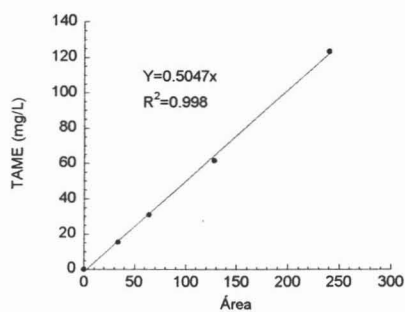
d.

Figura A-II. Curvas de calibración de los oxigenantes fase gas

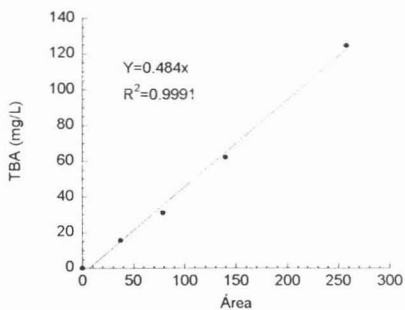
La serie anterior indica la cantidad de cada uno de los oxigenantes, cantidad relacionada en cada uno de los casos con el área correspondiente del análisis cromatográfico en fase gaseosa.



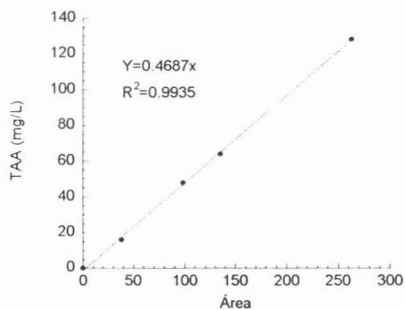
a.



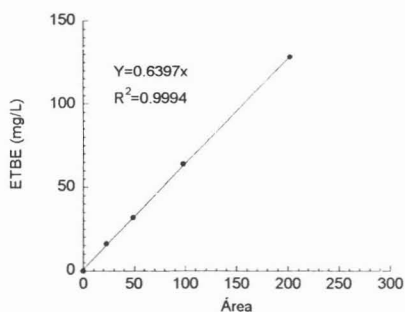
b.



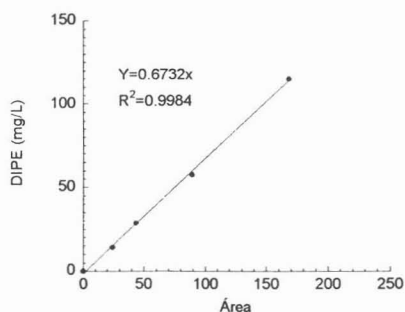
c.



d.



e.



f.

Figura A-III Curvas de calibración de los oxigenantes en fase líquida.

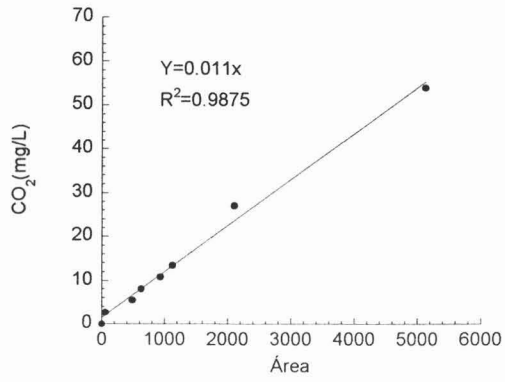


Figura A-IV. Curva estándar de CO₂.

Apéndice B. Proteína

B.1 Método Coomassie

Modificado de Sedmark *et al.*, (1977). Este ensayo se basa en la interacción entre el colorante y el grupo amino de las proteínas, esta interacción está en función de la concentración de H⁺. En este trabajo Coomassie fue utilizado para cuantificar la proteína inicial en cada microcosmos, por ser un método que puede detectar cantidades de proteína tan bajas de hasta 1 µg de proteína.

Reactivo de Coomassie, preparado con:

Coomassie Brilliant Blue G250 (Sigma), y ácido perclórico (APC).

Se diluyó un 0.06 % de colorante en 3% de APC (peso/volumen, 0.3M), mezclando por alrededor de una hora, para posteriormente filtrar en papel Whatman núm. 1.

B.1.2 Cuantificación de proteína por el método de Coomassie

De la muestra de proteína (células), se tomó 100 µL y se colocó en tubos Eppendorf®.

Al tubo con proteína se le adicionó solución salina (NaCl) 400 µL al 0.85% agitando muy bien, posteriormente también se le adicionó 500 µL (0.1 N) de hidróxido de sodio (NaOH), agitando nuevamente.

A continuación se colocó a baño María en agua hirviendo, durante una hora (hidrólisis). Una vez que la hidrólisis fue completa, se tomaron 500 µL del hidrolizado y se adicionó 500 µL del reactivo de Coomassie y se determinó indirectamente la cantidad de proteína en la muestra por medio de espectrofotometría, leyendo a una longitud de onda (λ) de 620 nm. Lo anterior se resume en la siguiente tabla:

Proteína µL	NaCl µL	NaOH µL	Hidrólisis	Reactivo de Coomassie µL	Leer λ 620 nm
100	400	500		500	

B.1.3 Curva de proteína.

Se realizó una curva estándar de proteína en mg/l para conocer la cantidad exacta de células a inocular.

Para realizar esta curva se colocaron cantidades conocidas y crecientes de proteína (soluciones patrón de 5,10, 20, 40, y 60 mg/l de albúmina bovina), el procesamiento de las muestras fue el mismo que el detallado anteriormente para las muestras experimentales.

Por ser un método altamente sensible la curva estándar se realizó en bajas concentraciones de albúmina, asegurando la curva lineal, pues a altas concentraciones ésta no se ajusta a una curva lineal.

La siguiente es la curva estándar de proteína (método Coomassie) utilizada en este trabajo.

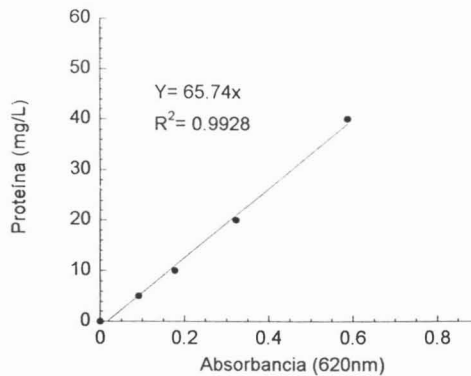


Figura B-I Curva estándar de proteína por el método de Coomassie.

B.2 Método de Lowry

Modificado de Lowry *et al* 1951, este es un ensayo colorimétrico el cual se basa en una reacción entre la proteína y el cobre en un medio alcalino, con una reducción posterior con el reactivo de Folin fenol, esta reacción es posible principalmente por los aminoácidos tirosina y triptofano.

Este ensayo fue bastante estable y pudo ser analizado aún después de una hora, lo que fue de mucha utilidad para el análisis masivo de las numerosas muestras. En este trabajo se utilizó el método de Lowry para la cuantificación de proteína final debido a que tiene un rango de sensibilidad más alta que el método de Coomassie, este rango es de 5-10 μg de proteína.

Reactivo de Lowry preparado con:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1% en H_2O Reactivo A, Tartrato doble de Na y K al 2% Reactivo B, NaCO_3 al 2% en NaOH al 0.1N Reactivo C, Una parte de A + una parte de B Reactivo D * Una parte de D + cincuenta partes de C Reactivo E *, Reactivo de Folin 1:1 con agua *, y NaOH 1N para hidrolizar.

*estos reactivos se preparan al momento de usarse.

B.2.2 Cuantificación de proteína por el método de Lowry

De la muestra de proteína (células) se tomó una alícuota de 2 ml, se colocó en un tubo de ensayo y se adicionó 0.5 ml de hidróxido de sodio (NaOH) 1N agitando muy bien, a continuación se colocó a baño María en agua hirviendo, durante 30 m. (hidrólisis). Posteriormente se tomó una muestra de 0.5 ml del hidrolizado y se llevó a un volumen de 1 ml (con agua), posteriormente se agregaron 5 ml del reactivo E, y se agitó vigorosamente, se dejó reposar 10 m. Posteriormente se agregaron 5ml del reactivo de Folin dejándose nuevamente reposar por 30 m. Después de transcurrido ese tiempo la muestra pudo ser determinada indirectamente por medio de espectrofotometría a una longitud de onda (λ) de 590 nm. Lo anterior se resume en el siguiente cuadro:

Proteína (ml)	NaOH (ml)	Hidrólisis por 30 m.	Proteína hidrolizada (ml)	Dilución con agua	Reactivo E (ml) Reposar 10 m.	Reactivo Folin (ml) Reposar 30 m.	Leer λ 590 nm
2	0.5		0.5		5	0.5	

B.2.3 Curva de proteína.

Se realizó una curva estándar de proteína (figura BII) en mg/l para conocer la cantidad final de células en cada microcosmos.

Para realizar esta curva se colocaron cantidades conocidas y crecientes de proteína (soluciones patrón de albúmina bovina), el procesamiento de las muestras es el mismo que el detallado anteriormente para las muestras experimentales.

En este caso el método permitió que las concentraciones de albúmina fuesen más altas para garantizar la curva lineal, y que los datos experimentales en concentraciones altas se ajustaran a la curva.

A continuación se presenta la curva estándar de proteína con el método de Lowry.

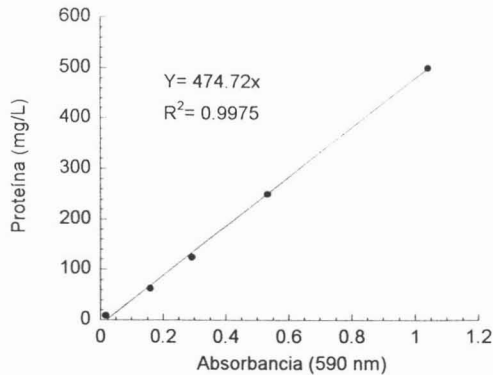


Figura B-II Curva estándar de proteína por el método de Lowry.

APÉNDICE C. Producción de CO₂, consumo de O₂ y producción de biomasa

Las series de gráficas que a continuación se presentan enfatizan como la producción de CO₂, el consumo de O₂ y la producción de biomasa (indirectamente determinada por cuantificación de proteína) corroboran de manera experimental la capacidad del consorcio MI-P de degradar y mineralizar completamente los oxigenantes, utilizando como fuente de carbono alterna alcanos de cadena corta.

Las series de graficas C-I a C-IV muestran la producción de CO₂ cuando el consorcio consumió la totalidad de los n-alcanos y los oxigenantes probados, el análisis general de estas gráficas muestra que la producción de este gas es mayor cuando se adicionaron juntos el alcano y el oxigenante, a diferencia de cuando se adicionó el alcano solo.

En las gráficas de DIPE y ETBE para heptano, butano y propano la diferencia en producción de CO₂ se observó significativamente inestable, lo que corrobora un consumo nulo por parte del consorcio de estos éteres. Para estos mismos éteres en hexano se observa para las concentraciones más altas de este alcano un consumo limitado y para las más pequeñas un consumo nulo.

Las siguientes series de gráficas C-V a C-VIII, consumo de O₂ corroboran los resultados de las series anteriores con respecto al DIPE y el ETBE.

Con respecto al análisis de producción de biomasa en todas las series de graficas (C-IX a CXII) se muestra que no hay diferencia en la producción de el alcano solo y del alcano con el oxigenante en turno, esto corrobora que no hay asimilación de los oxigenantes por parte de los microorganismos para sus procesos vitales.

Finalmente es importante señalar que las diferencias que se puedan observar en las gráficas con respecto a lo dicho anteriormente, no se deben a los procesos propios del metabolismo del consorcio o su comportamiento, sino a errores de manipulación al momento de adicionar los compuestos.

CO₂ y O₂ de alcanos y alcanos + oxigenantes

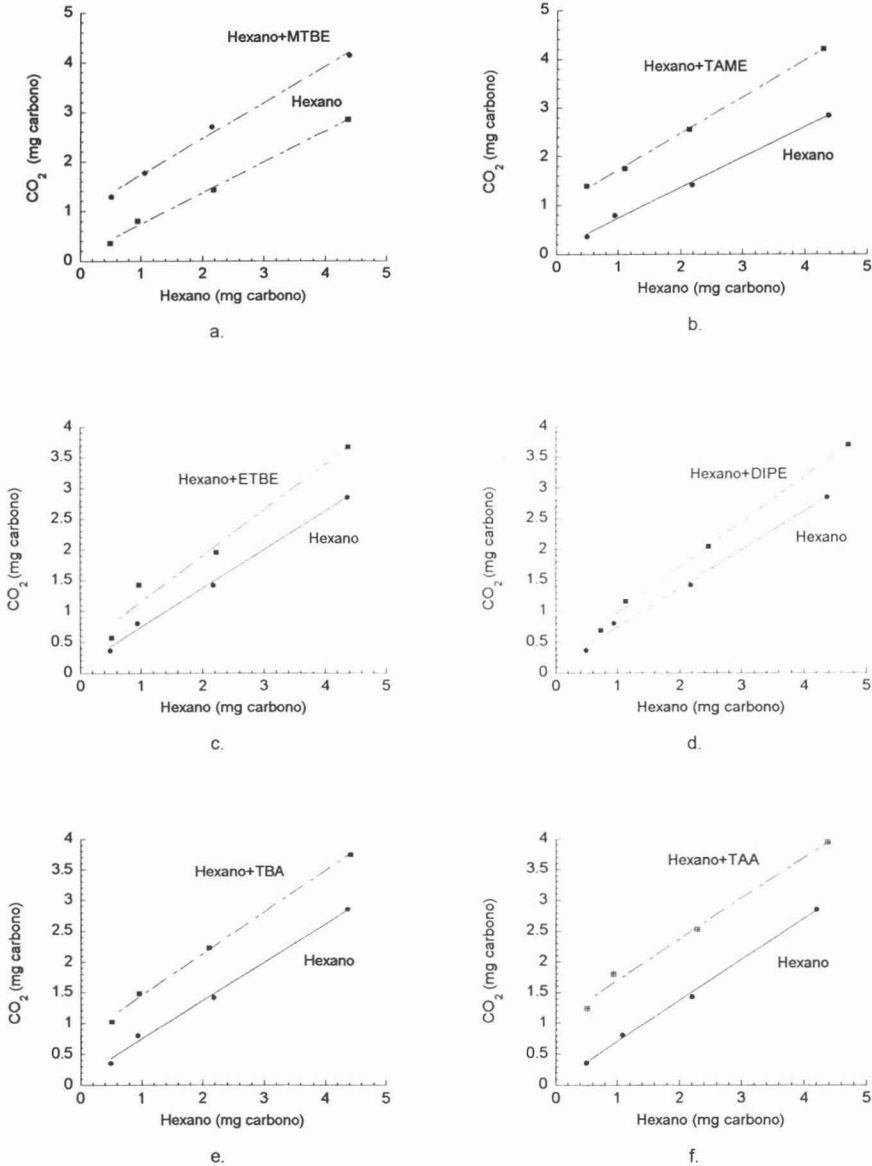
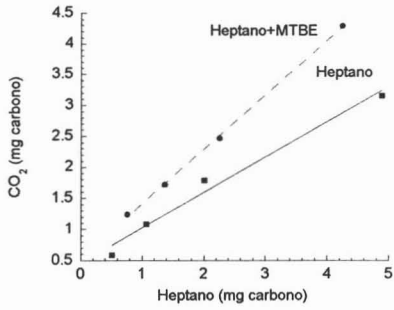
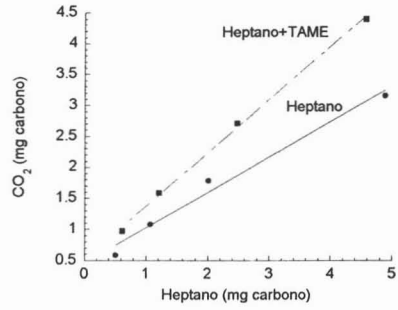


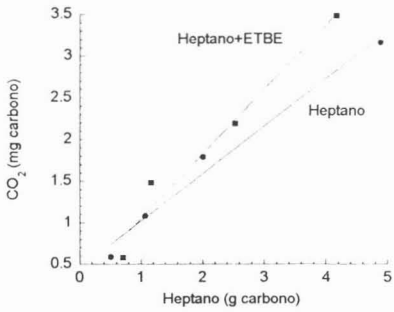
Figura C-I. Producción de CO₂ de hexano con los oxigenantes probados.



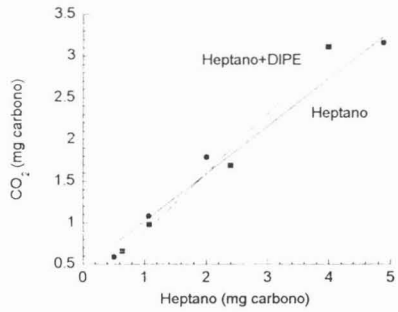
a.



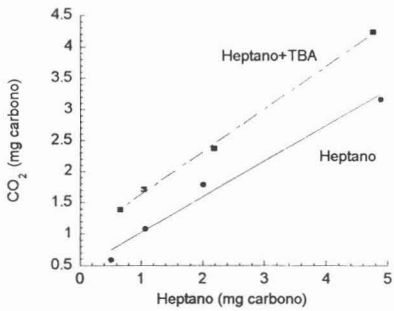
b.



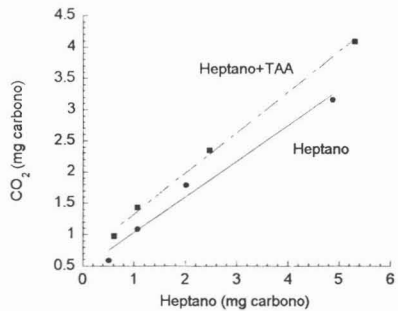
c.



d.

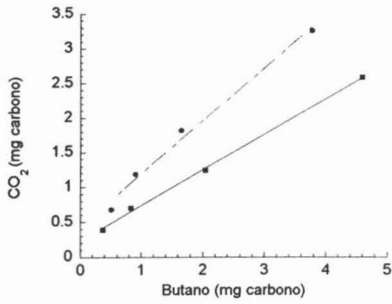


e.

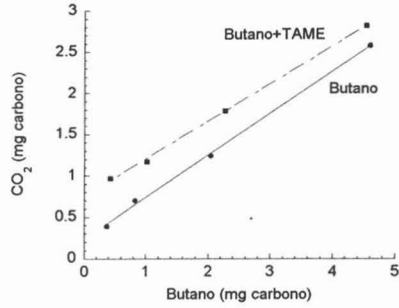


f.

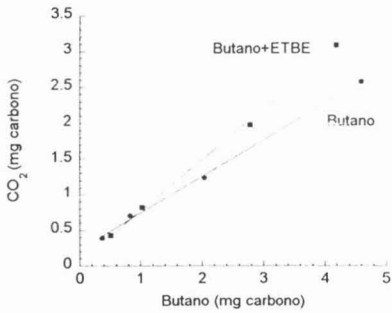
Figura C-II. Producción de CO₂ de heptano con los oxigenantes probados.



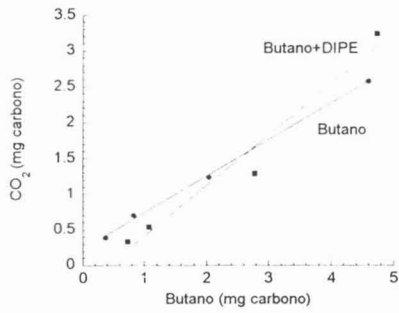
a.



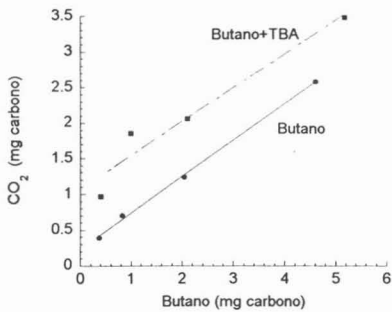
b.



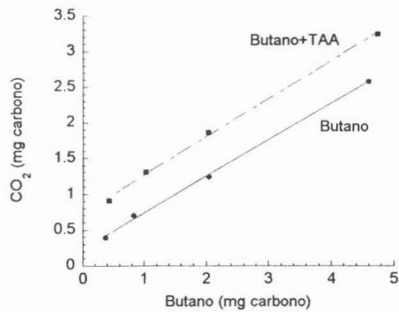
c.



d.



e.



f.

Figura C-III. Producción de CO₂ de butano con los oxigenantes oles probados.

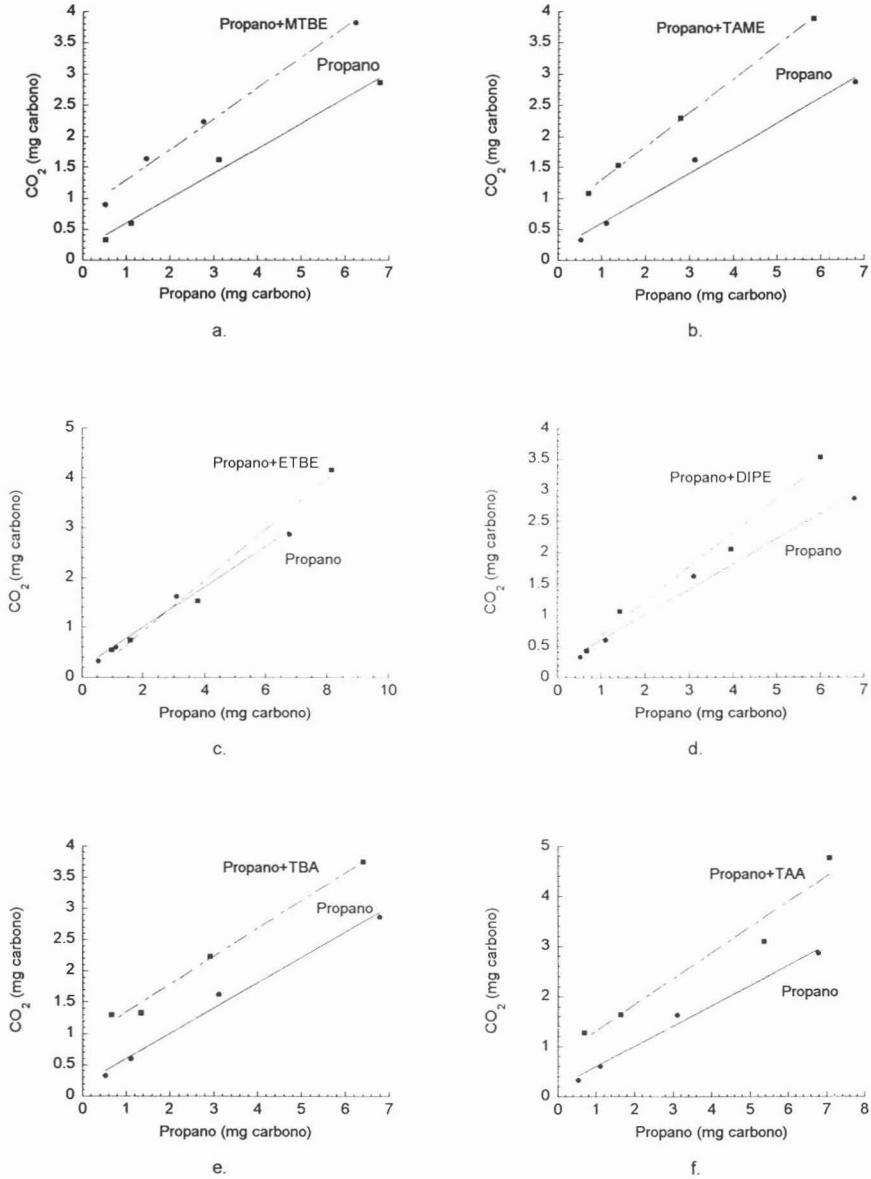
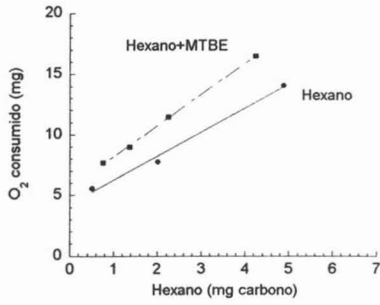
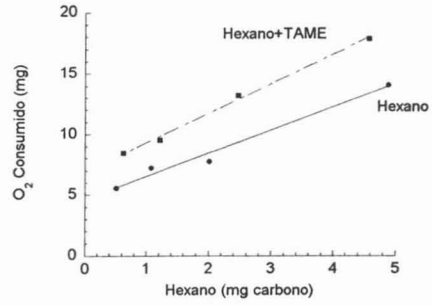


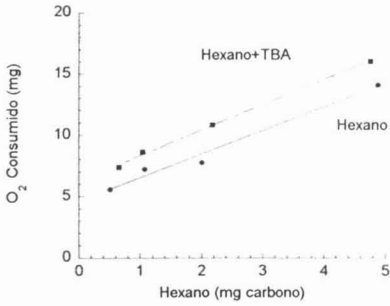
Figura C-IV. Producción de CO₂ de propano con los oxigenantes probados.



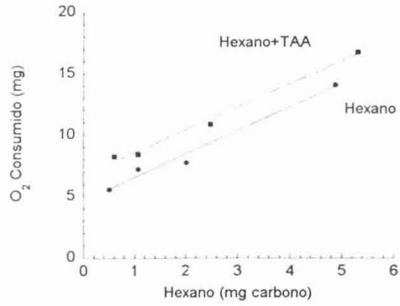
a.



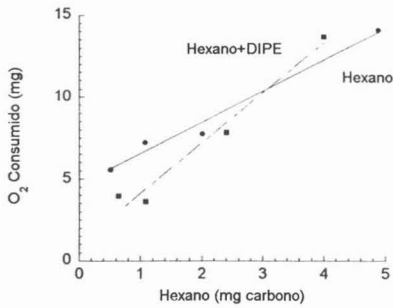
b.



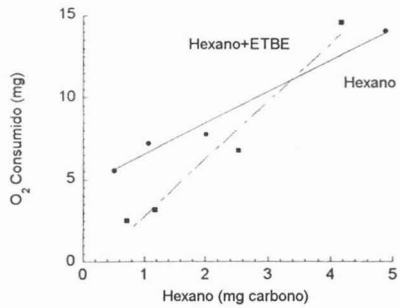
c.



d.

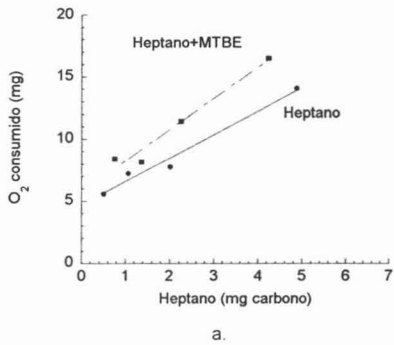


e.

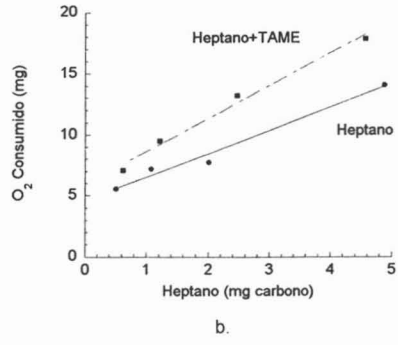


f.

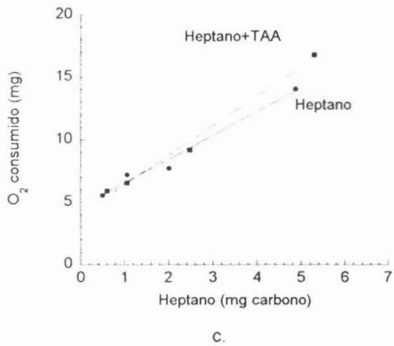
Figura C-V. Consumo de O₂ de hexano con los oxigenantes probados.



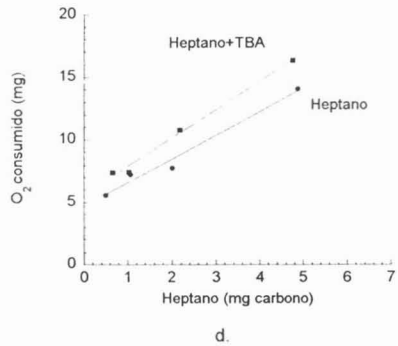
a.



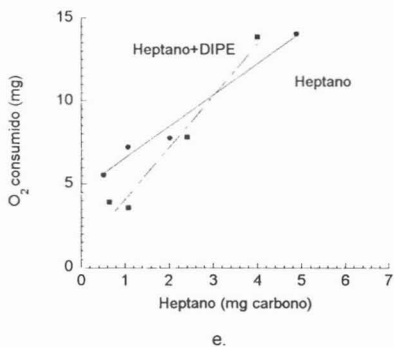
b.



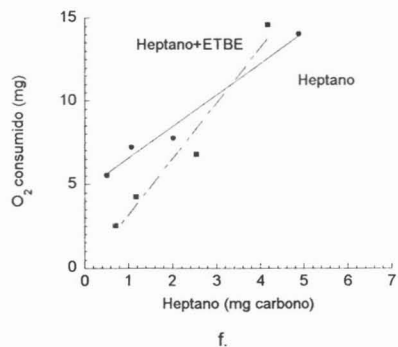
c.



d.

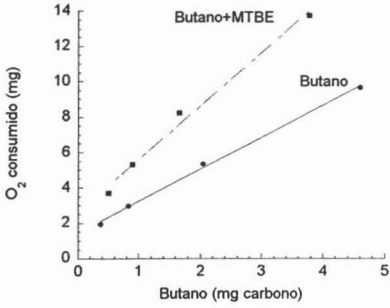


e.

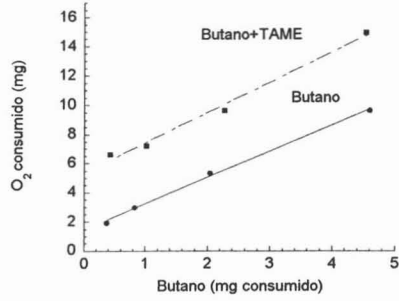


f.

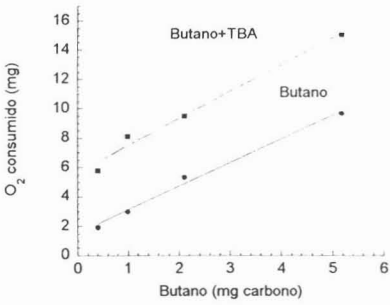
Figura C-VI. Consumo de O₂ de heptano con los oxigenantes probados.



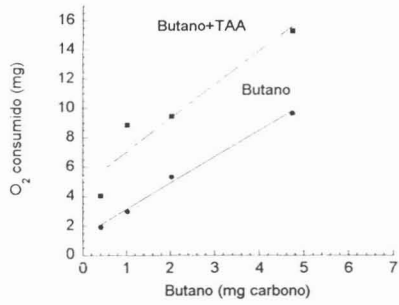
a.



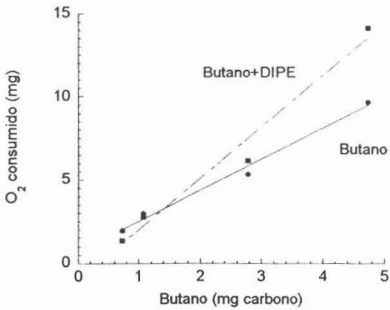
b.



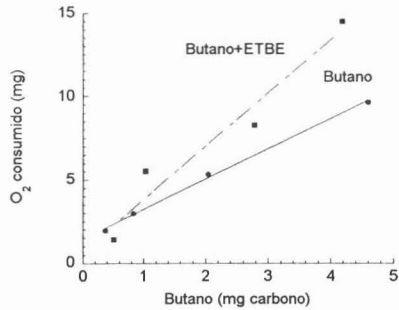
c.



d.

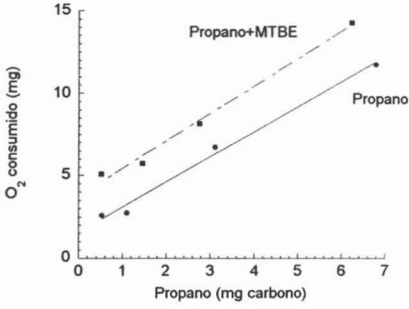


e.

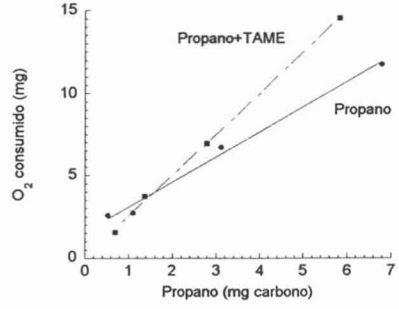


f.

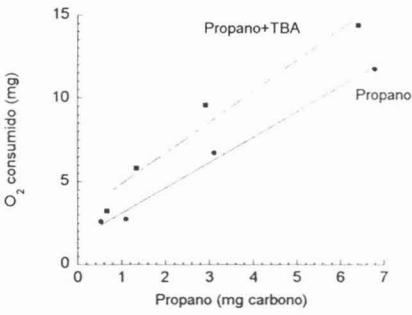
Figura C-VII. Consumo de O_2 de butano con los oxigenantes probados.



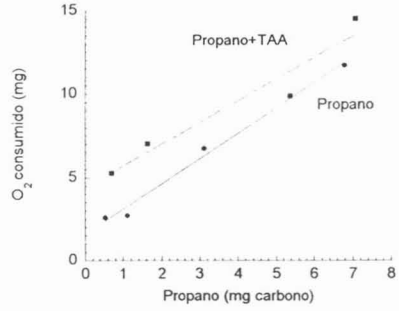
a.



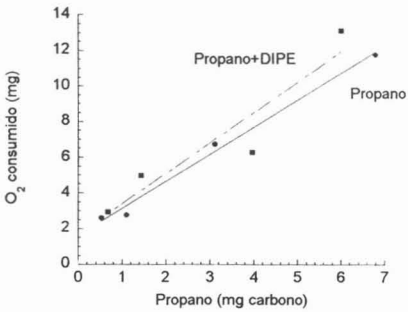
b.



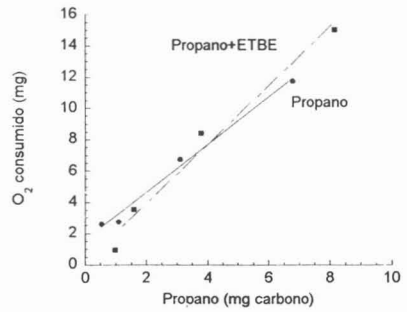
c.



d.



e.



f.

Figura C-VIII. Consumo de O₂ de propano con los oxigenantes probados.

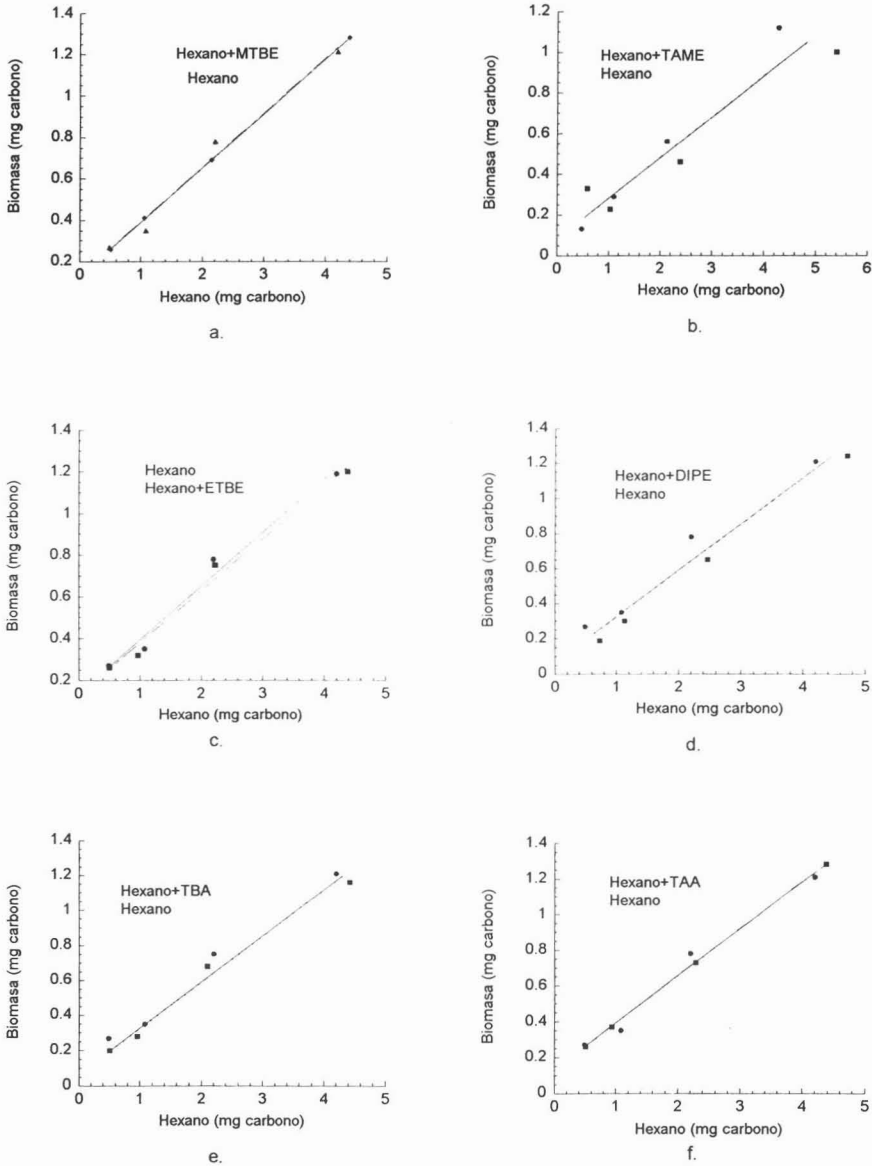


Fig. C-IX Producción de biomasa de hexano solo y de hexano con cada uno de los oxigenantes

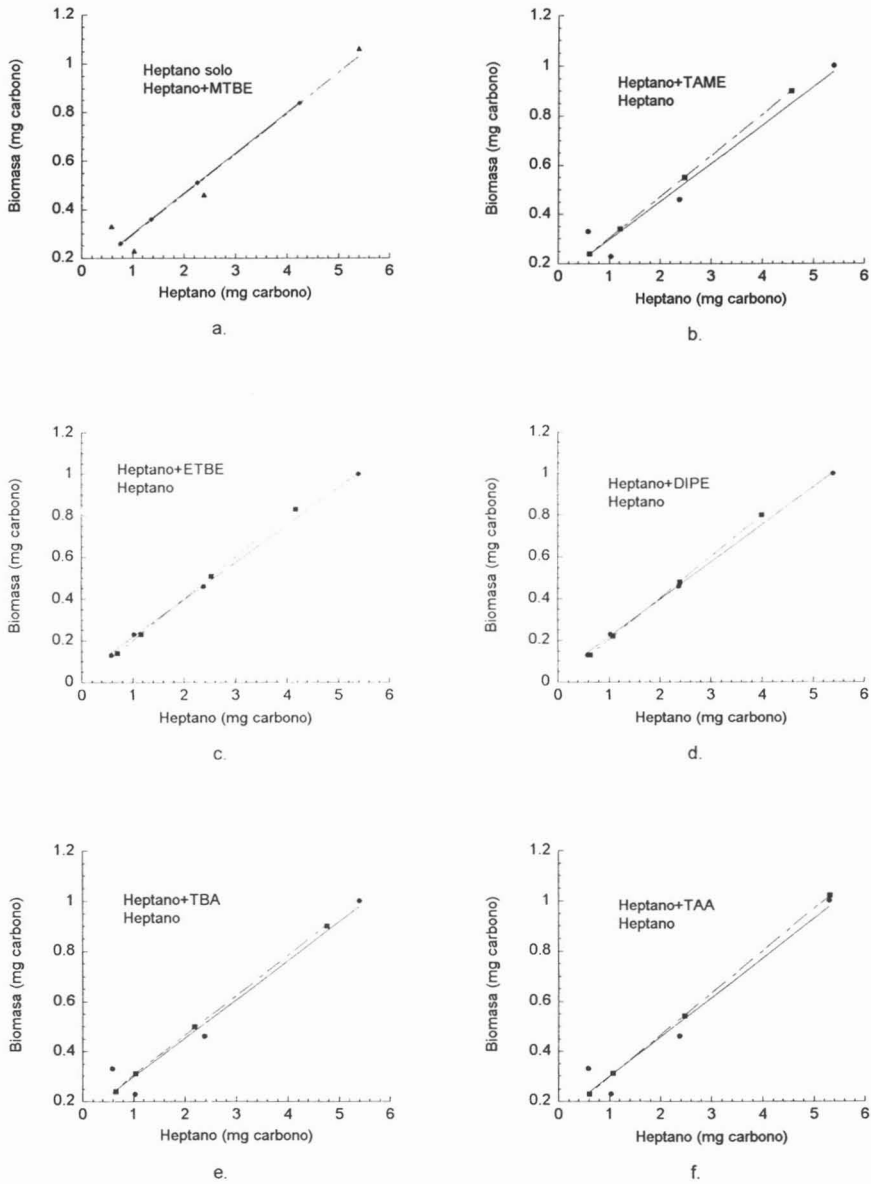
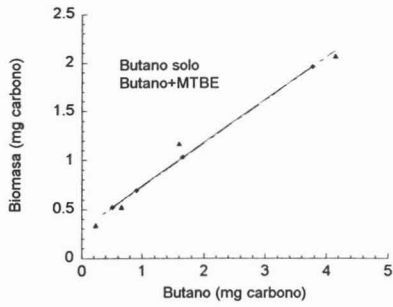
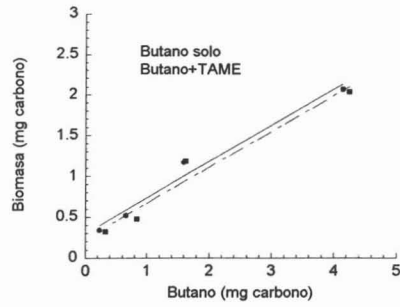


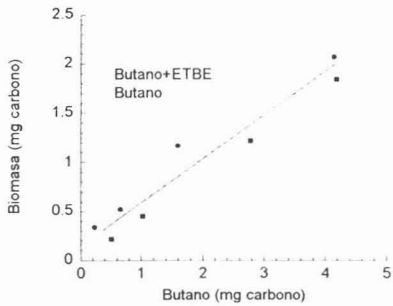
Fig. C-X Producción de biomasa de heptano solo y de heptano con cada uno de los oxigenantes



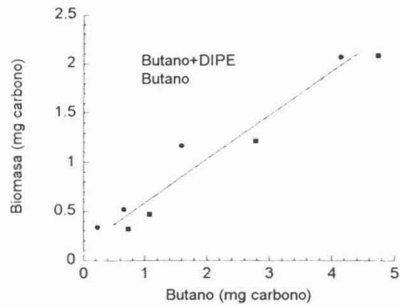
a.



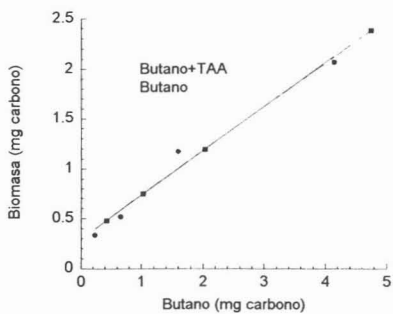
b.



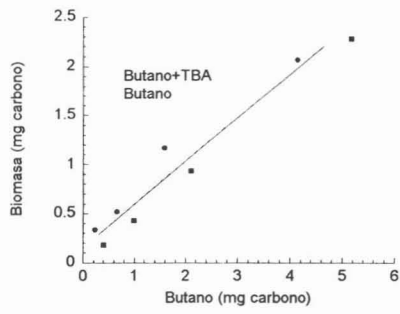
c.



d.

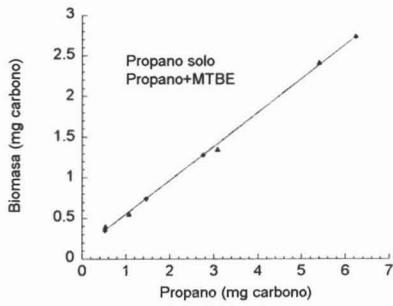


e.

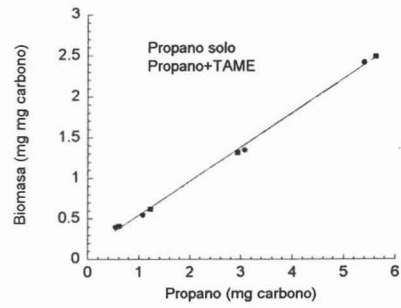


f.

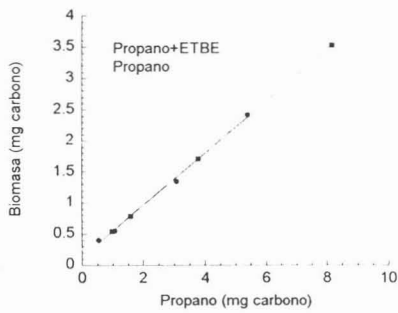
Fig. C-XI Producción de biomasa de butano solo y de butano con cada uno de los oxigenantes



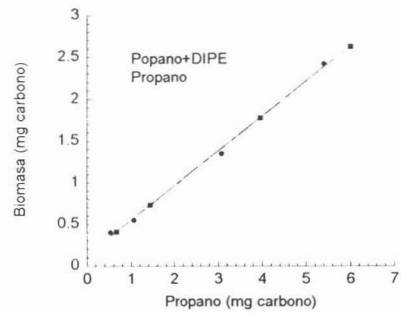
a.



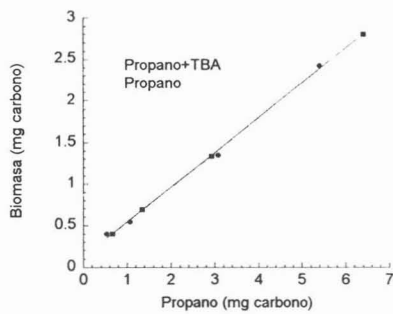
b.



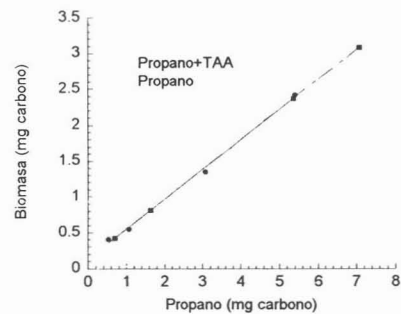
c.



d.



e.



f.

Fig. C-XII Producción de biomasa de propano solo y de propano con cada uno de los oxigenantes

Apéndice D. Balances de carbono de las cinéticas

Resumen global de carbono en alcanos

La siguiente tabla nos muestra el resumen global de carbono del CO₂ de cada uno de los alcanos con cada una de las condiciones ensayadas en este trabajo.

	Propano				Butano				Pentano				Hexano				Heptano			
Reactivos																				
carbono del alcano	0.53	1.1	3.11	6.79	0.37	0.83	2.04	4.60	0.65	1.08	2.04	4.09	0.49	0.94	2.18	4.37	0.51	1.07	2.01	4.88
carbono de CO ₂	0.33	0.60	1.62	2.86	0.39	0.70	1.24	2.58	0.26	0.45	1.00	2.10	0.36	0.80	1.42	2.85	0.59	1.08	1.79	3.16
Productos																				
Recuperación de carbono como CO ₂	0.63	0.54	0.52	0.42	1.0	0.85	0.61	0.56	0.40	0.41	0.49	0.51	0.73	0.85	0.65	0.65	1.0	1.0	0.89	0.65

Tabla D-I. Resumen global de la fuente de carbono en CO₂ de cada uno de los alcanos utilizados en este trabajo.

En la siguiente tabla se muestra el resumen total de carbono en forma de biomasa de cada uno de los alcanos con cada una de las condiciones de este trabajo.

	Propano				Butano				Pentano				Hexano				Heptano			
Reactivos																				
carbono del alcano	0.53	1.07	3.07	5.40	0.23	0.66	1.59	4.14	0.63	1.33	2.47	3.50	0.49	1.08	2.20	4.20	0.59	1.03	2.38	5.39
carbono como biomasa	0.40	0.55	1.35	2.42	0.34	0.52	1.17	2.07	0.61	0.87	1.27	1.93	0.27	0.35	0.78	1.21	0.33	0.23	0.46	1.06
Productos																				
Recuperación de carbono	0.75	0.51	0.44	0.45	1.00	0.79	0.74	0.50	0.97	0.66	0.51	0.55	0.54	0.33	0.35	0.29	0.56	0.23	0.20	0.20

Tabla D-II. Resumen global de la fuente de carbono en Biomasa de cada uno de los alcanos utilizados en este trabajo.

A continuación se presentan los resúmenes globales de la fuente de carbono de cada uno de los éteres y alcoholes probados en este trabajo.

Resumen global de carbono en MTBE

	Propano				Butano				Pentano				Hexano				Heptano			
Reactivos																				
Carbono del alcano	0.52	1.46	2.75	6.24	0.50	0.90	1.65	3.77	0.56	1.06	2.38	4.33	0.51	1.06	2.15	4.39	0.76	1.37	2.25	4.24
Carbono del MTBE consumido	0.61	0.94	1.00	1.04	0.77	0.90	1.03	1.06	0.61	1.00	1.02	1.06	0.97	0.98	1.01	1.01	0.81	0.78	1.04	1.04
Total	1.14	2.39	3.75	7.28	1.27	1.80	2.68	4.83	1.16	2.06	3.39	5.38	1.48	2.05	3.16	5.41	1.56	2.15	3.29	5.28
Productos																				
Carbono del MTBE no consumido	0.34	0.08	0.00	0.00	0.39	0.02	0.00	0.00	0.61	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.20	0.20	0.00	0.00
Carbono como TBA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Carbono de CO ₂	0.90	1.64	2.24	3.81	0.68	1.19	1.82	3.25	0.74	1.22	1.94	2.65	1.29	1.77	2.70	4.14	1.24	1.72	2.47	4.29
Carbono de biomasa	0.35	0.74	1.28	2.73	0.52	0.69	1.03	1.96	0.53	0.75	1.35	2.23	0.26	0.41	0.69	1.28	0.26	0.36	0.51	0.84
Total	1.58	2.45	3.52	6.54	1.58	1.89	2.84	5.21	1.97	1.97	3.29	4.87	1.55	2.17	3.39	5.42	1.70	2.28	2.98	5.13
Recuperación Global																				
Recuperación de carbono	1.0	0.99	0.94	0.90	0.94	1.0	1.0	1.0	1.0	0.95	0.97	0.91	1.0	1.0	1.0	1.00	1.0	1.0	0.90	0.97
Recuperación de carbono como biomasa	0.30	0.31	0.34	0.38	0.41	0.38	0.38	0.41	0.46	0.36	0.40	0.41	0.18	0.20	0.22	0.24	0.17	0.17	0.15	0.16
Recuperación de carbono como CO ₂	0.79	0.68	0.60	0.52	0.54	0.66	0.68	0.67	0.63	0.59	0.57	0.49	0.87	0.86	0.85	0.76	0.79	0.80	0.75	0.81

Tabla D-III. Resumen global de las fuentes de carbono del MTBE y cada uno de los alcanos probados

Resumen global de carbono del TAME

	Propano				Butano				Pentano				Hexano				Heptano			
Reactivos																				
Carbono del alcano	0.70	1.37	2.79	5.84	0.42	1.01	2.27	4.54	0.63	0.98	2.20	4.31	0.48	1.10	2.13	4.28	0.62	1.21	2.47	4.57
Carbono del TAME consumido	0.69	0.97	0.98	1.00	0.70	0.88	0.76	0.76	0.73	1.09	1.09	1.09	0.93	1.05	1.08	1.09	0.51	0.73	0.61	0.75
Total	1.39	2.34	3.76	6.84	1.12	1.89	3.03	5.30	1.37	2.06	3.29	5.41	1.42	2.15	3.21	5.37	1.13	1.94	3.08	5.32
Productos																				
Carbono del TAME no consumido	0.36	0.00	0.00	0.00	0.18	0.00	0.00	0.00	0.35	0.00	0.00	0.00	0.15	0.04	0.00	0.00	0.33	0.18	0.60	0.75
Carbono como TAA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.48	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.16
Carbono de CO ₂	1.08	1.53	2.30	3.87	0.97	1.17	1.79	2.82	0.64	1.18	2.25	3.69	1.39	1.75	2.56	4.21	0.97	1.59	2.71	4.40
Carbono de biomasa	0.42	0.70	1.29	2.56	0.18	0.44	1.00	2.00	0.56	0.72	1.27	2.22	0.13	0.29	0.56	1.12	0.24	0.34	0.55	0.90
Total	1.49	2.23	3.59	6.43	1.33	1.61	2.79	4.82	1.68	1.90	3.52	5.91	1.52	2.04	3.12	5.34	1.21	1.92	3.29	5.45
Recuperación Global																				
Recuperación de carbono	1.0	0.95	0.95	0.94	1.0	0.85	0.92	0.91	1.2*	0.92	1.07	1.0	1.0	0.95	0.97	0.99	1.0	0.99	1.0	1.0
Recuperación de carbono como biomasa	0.30	0.30	0.34	0.38	0.17	0.24	0.33	0.38	0.41	0.35	0.39	0.41	0.09	0.13	0.17	0.21	0.21	0.17	0.18	0.17
Recuperación de carbono como CO ₂	0.78	0.65	0.61	0.57	0.87	0.62	0.59	0.53	0.47	0.57	0.69	0.68	0.98	0.82	0.80	0.78	0.86	0.82	0.88	0.83

Tabla D-IV. Resumen global de las fuentes de carbono del TAME y cada uno de los alcanos probados

Resumen global de carbono del TBA

	Propano				Butano				Pentano				Hexano				Heptano			
Reactivos																				
Carbono del alcano	0.66	1.34	2.92	6.40	0.40	0.99	2.10	5.18	0.59	1.05	2.24	3.93	0.51	0.96	2.10	4.42	0.66	1.04	2.18	4.76
Carbono del TBA consumido	0.82	1.02	1.06	0.83	0.99	1.02	1.08	1.07	0.35	1.01	1.02	1.03	0.85	0.85	0.85	0.85	0.93	1.05	0.97	0.96
Total	1.47	2.35	3.97	7.23	1.39	2.01	3.19	6.25	0.95	2.07	3.25	4.96	1.35	1.81	2.95	5.28	1.59	2.10	3.15	5.71
Productos																				
Carbono del TBA no consumido	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Carbono de CO ₂	1.30	1.33	2.23	3.74	0.97	1.85	2.06	3.48	0.53	1.42	2.02	2.86	1.03	1.48	2.23	3.74	1.39	1.71	2.37	4.23
Carbono de biomasa	0.40	0.69	1.34	2.80	0.18	0.43	0.93	2.28	0.55	0.76	1.30	2.08	0.13	0.25	0.55	1.16	0.24	0.31	0.50	0.93
Total	1.70	2.01	3.57	6.54	1.15	2.29	2.99	5.76	1.08	2.18	3.32	4.94	1.16	1.73	2.78	4.90	1.63	2.02	2.86	5.15
Recuperación Global																				
Recuperación de carbono	1.0	0.85	0.90	0.90	0.82	1.0	0.94	0.92	1.0	1.0	1.0	1.00	0.86	0.95	0.94	0.93	1.0	0.96	0.91	0.90
Recuperación de carbono como biomasa	0.27	0.29	0.34	0.39	0.13	0.22	0.29	0.36	0.58	0.37	0.40	0.42	0.10	0.14	0.19	0.22	0.15	0.15	0.16	0.16
Recuperación de carbono como CO ₂	0.88	0.56	0.56	0.52	0.70	0.92	0.65	0.56	0.56	0.69	0.62	0.58	0.76	0.81	0.75	0.71	0.87	0.82	0.75	0.74

Tabla D-V. Resumen global de las fuentes de carbono del TBA y cada uno de los alcanos probados

Resumen global de carbono del TAA

	Propano				Butano				Pentano				Hexano				Heptano			
	Reactivos																			
Carbono del alcano	0.70	1.63	5.37	7.07	0.42	1.03	2.03	4.74	0.56	1.24	1.94	4.27	0.51	0.93	2.29	4.38	0.61	1.07	2.47	5.31
Carbono del TAA consumido	0.99	1.05	1.01	1.02	0.94	1.02	0.98	1.30	0.49	0.92	1.21	1.10	1.09	1.10	1.10	1.09	0.58	0.78	0.57	0.54
Total	1.69	2.68	6.38	8.09	1.36	2.06	3.02	6.03	1.05	2.16	3.14	5.37	1.61	2.03	3.39	5.48	1.19	1.85	3.03	5.85
	Productos																			
Carbono del TAA no consumido	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.60	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50	0.38	0.52	0.57
Carbono de CO ₂	1.28	1.63	3.09	4.76	0.91	1.31	1.86	3.24	0.54	1.54	2.22	ND	1.24	1.80	2.52	3.93	0.97	1.43	2.34	4.09
Carbono de biomasa	0.42	0.81	2.37	3.08	0.48	0.75	1.19	2.38	0.53	0.84	1.15	2.20	0.26	0.37	0.73	1.28	0.23	0.31	0.54	1.02
Total	1.70	2.44	5.46	7.84	1.39	2.06	3.05	5.62	1.07	2.38	3.37	ND	1.50	2.18	3.25	5.21	1.20	1.74	2.88	2:37
	Recuperación Global																			
Recuperación de carbono	1.0	0.91	0.86	0.97	1.0	1.0	1.0	0.93	1.0	1.0	1.0	ND	0.94	1.0	0.96	0.95	1.0	0.94	0.95	0.87
Recuperación de carbono como biomasa	0.25	0.30	0.37	0.38	0.35	0.37	0.40	0.39	0.50	0.39	0.37	0.41	0.16	0.18	0.22	0.23	0.20	0.17	0.18	0.17
Recuperación de carbono como CO ₂	0.76	0.61	0.48	0.59	0.67	0.64	0.62	0.54	0.51	0.71	0.71	ND	0.77	0.89	0.75	0.72	0.82	0.77	0.77	0.70

Tabla D-VI. Resumen global de las fuentes de carbono del TAA y cada uno de los alcanos probados

Resumen global de carbono del ETBE

	Propano				Butano				Pentano				Hexano				Heptano			
	Reactivos																			
Carbono del alcano	0.98	1.59	3.79	8.16	0.50	1.03	2.78	4.18	0.70	0.87	2.09	4.11	0.52	0.97	2.23	4.38	0.71	1.17	2.53	4.17
Carbono del ETBE consumido	0.07	0.20	0.36	0.42	0.00	0.30	0.39	0.48	0.34	0.84	1.12	1.22	0.25	0.48	0.49	0.77	0.23	0.30	0.30	0.41
Total	1.05	1.79	4.15	8.58	0.50	1.33	3.17	4.66	1.03	1.71	3.21	5.34	0.78	1.45	2.72	5.15	0.94	1.48	2.83	4.58
	Productos																			
Carbono del ETBE no consumido	0.56	0.57	0.85	0.25	0.62	0.34	0.20	0.04	0.59	0.21	0.00	0.00	0.70	0.45	0.46	0.22	0.92	0.89	0.82	0.71
Carbono como TBA	0.0	0	0	0.00	0.0	0	0	0.00	0.08	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.04	0.00	0.00
Carbono de CO ₂	0.55	0.75	1.53	4.16	0.43	0.82	1.97	3.08	0.59	0.76	2.12	3.01	0.57	1.43	1.96	3.67	0.58	1.48	2.19	3.48
Carbono de biomasa	0.54	0.79	1.71	3.53	0.22	0.45	1.22	1.84	0.35	0.44	1.05	2.06	0.14	0.26	0.59	1.15	0.14	0.23	0.51	0.83
Total	1.09	1.54	3.24	7.69	1.27	1.61	3.40	4.95	1.02	1.30	3.17	5.07	0.71	1.68	2.55	4.82	0.75	1.76	2.70	7:27
	Recuperación Global																			
Recuperación de carbono	1.0	0.86	0.78	0.90	2.5*	1.0	1.0	1.06	0.99	0.76	0.99	0.95	0.91	1.0	0.94	0.93	0.80	1.0	0.95	0.94
Recuperación de carbono como biomasa	0.51	0.44	0.41	0.41	0.44	0.34	0.39	0.39	0.34	0.25	0.33	0.39	0.18	0.18	0.22	0.22	0.15	0.16	0.18	0.18
Recuperación de carbono como CO ₂	0.53	0.42	0.37	0.48	0.85	0.62	0.62	0.66	0.57	0.44	0.66	0.56	0.73	0.98	0.72	0.71	0.61	1.00	0.77	0.76

Tabla D-VII. Resumen global de las fuentes de carbono del ETBE y cada uno de los alcanos probados

Resumen global de carbono del DIPE

	Propano				Butano				Pentano				Hexano				Heptano			
Reactivos																				
Carbono del alcano	0.67	1.44	3.96	6.00	0.73	1.07	2.78	4.73	0.59	1.05	2.08	3.89	0.73	1.13	2.47	4.71	0.64	1.08	2.40	3.99
Carbono del DIPE consumido	0.19	0.27	0.45	0.70	0.14	0.17	0.15	0.30	0.32	0.33	0.58	0.92	0.20	0.37	0.41	0.38	0.30	0.23	0.18	0.24
Total	0.87	1.72	4.41	6.71	0.87	1.24	2.93	5.03	0.90	1.38	2.65	4.80	0.93	1.49	2.87	5.10	0.94	1.31	2.58	4.23
Productos																				
Carbono del ETBE no consumido	0.75	0.73	0.51	0.30	0.56	0.49	0.09	0.38	0.69	0.52	0.36	0.02	0.82	0.65	0.61	0.63	0.69	0.70	0.78	0.54
Carbono de CO ₂	0.42	1.06	2.05	3.52	0.34	0.54	1.29	3.24	0.51	0.88	1.44	3.09	0.69	1.16	2.05	3.70	0.66	0.98	1.69	3.11
Carbono de biomasa	0.41	0.73	1.78	2.63	0.32	0.47	1.22	2.08	0.29	0.53	1.04	1.94	0.19	0.30	0.65	1.24	0.13	0.22	0.48	0.80
Total	0.83	1.79	3.83	6.16	1.21	1.50	2.60	5.70	0.81	1.41	2.48	5.04	0.88	1.46	2.69	4.94	0.79	1.19	2.17	21.42
Recuperación Global																				
Recuperación de carbono	0.95	1.0	0.87	0.92	1.4*	1.21	0.89	1.0	0.89	1.0	0.93	1.0	0.95	0.98	0.94	0.97	0.84	0.91	0.84	0.92
Recuperación de carbono como biomasa	0.47	0.43	0.40	0.39	0.37	0.38	0.42	0.41	0.50	0.38	0.39	0.40	0.21	0.20	0.23	0.24	0.14	0.16	0.19	0.19
Recuperación de carbono como CO ₂	0.48	0.62	0.46	0.53	0.39	0.43	0.44	0.64	0.57	0.64	0.54	0.64	0.74	0.78	0.71	0.73	0.71	0.75	0.65	0.73

Tabla D-VIII. Resumen global de las fuentes de carbono del DIPE y cada uno de los alcanos probados

* La cuantificación de biomasa y CO₂ no se realizaron al mismo tiempo.