



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Caracterización de la eliminación del alcohol terbutílico
(TBA) en un biorreactor de lecho empacado a escala
laboratorio**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

NANCY CRUZ SANCHEZ



**DRA. MARCIA GUADALUPE MORALES
IBARRÍA**

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado bajo
la dirección de la Dra. Marcia
Morales Ibarria en el Laboratorio
de Emisiones Gaseosas W-107
en la Universidad Autónoma
Metropolitana Unidad Iztapalapa

Al Consejo Nacional de Ciencia
y Tecnología (CONACyT) por el
apoyo económico otorgado para
la realización de este trabajo en el marco
del proyecto CONACyT
bajo responsabilidad
de la Dra. Marcia Morales

Le agradezco a Dios por permitirme llegar a cumplir esta primera meta de un largo camino que aún me falta por recorrer, ahora sé que con esfuerzo, perseverancia, paciencia, amor y las ganas de superación han permitido que haya logrado lo que tanto he anhelado.

A mi padre por todos los consejos, por los valores que siempre me inculco, por que cuando creí no poder él me enseñó a confiar en mí y ver la fortaleza que tengo, porque aunque permanecía estar ajeno a toda mi vida, sé que en el fondo se preocupaba por mí.

A mi madre por que todo lo que he llegado a ser hasta hoy es por haber compartido contigo mis lágrimas y mis sonrisas; porque siempre has estado conmigo, por que siempre he recibido tu apoyo incondicional a pesar de la situación que yo sé que es difícil, porque siempre me mostraste que tu estabas ahí a mi lado y no tenía nada de que preocuparme, por tantas adversidades que pasamos y que supimos salir de esas, porque eres y fuiste un gran motor en mí para que yo concluyera esta etapa, por que son tantas cosas que tengo que agradecerte y sé que no me cabría en esta página gracias por todo... Todo esto te lo debo a ti ... ¡Te amo madre!

“Un día conocí la estrella más brillante del cielo oscuro. Ese mismo día conocí una parte de mí que tenía escondida. Encontré en un día, lo que había buscado toda mi vida; te encontré a ti”.

Gracias Daniel por todo tu apoyo, por tu amor, por tus consejos, por tu paciencia, por que durante este largo camino que recorrí siempre estuviste a mi lado apoyándome; por que formas parte de ese motor que siempre me impulso a seguir adelante, por que me motivaste para que concluyera, por que tu y mi madre fueron la parte fundamental para que yo haya logrado esto, gracias muñeco. ¡Te amo Dany!

A mis hermanos, Christian porque a pesar de la distancia siempre te preocupaste por mí, Anita porque sin ti nunca hubiera descubierto la fuerza tan grande que hay en mí, a mi Pollito porque sin ti yo no hubiera aprendido a verle siempre el lado bueno a las cosas, a Queta Linda porque siempre tengo de ti tus consejos y tu apoyo incondicional que siempre me motivaban a seguir adelante; a todos ustedes por eternamente estar conmigo, por todos los consejos que siempre me dieron y nunca dejaron que me venciera en el camino.

A mi abue Conchita, a mi tía Yola y primos con los que siempre conté y siempre me apoyaron.

A mi familia tijuana, en especial a mi tía Güerita y a la Tika que a pesar de la distancia que hay entre nosotros eso no fue obstáculo para siempre apoyarme, motivarme y saber que de ellas siempre tendré su apoyo incondicional.

A toda la familia Gómez Contreras por que siempre me apoyaron de una forma u otra, por haberme exhortado a terminar mi carrera, gracias futura familia!!!

A mis fieles amigas de la carrera con las cuales pase los momentos más felices, increíbles e inolvidables de mi vida Lupita, Tabita, Paola y Aris.

A todos mis compañeros de laboratorio Carlina, Sandy, Clau, Maribel, Rox, Angie, Everth, y en especial a Elia por todos tus consejos, tu apoyo, tus comentarios y por que gran parte de todo lo que aprendí en la realización de mi Tesis fue gracias a ti.

Agradezco a mi Directora de Tesis la Dra. Marcia Morales por todas sus enseñanzas, tiempo, comprensión, paciencia y el infinito apoyo que siempre me otorgo.

Agradezco a mi querida Universidad Nacional Autónoma de México por tanto que me dio y de lo orgullosa que soy de formar parte de ella, sin duda en mi cuerpo corre sangre azul y oro!

Pollito solo faltas tú.

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 al problema de contaminación por plomo y al mismo tiempo mejorar la combustión de la gasolina.

El uso creciente de este tipo de compuestos oxigenados ha generado otro tipo de problema, como es la contaminación de los mantos acuíferos debido a los derrames y evaporación durante la obtención y transporte de los oxigenantes, por accidentes durante el transporte de las tuberías subterráneas. El MTBE y el Alcohol Ter-butílico (TBA) presentan una alta solubilidad en agua, y el MTBE ha sido clasificado como potencialmente cancerígeno para los humanos, por lo que es necesario removerlo.

En la actualidad existen diversos tratamientos para ello y la aplicación de éstos dependerá de las concentraciones de MTBE o TBA y las características del sitio contaminado. La bioremediación, es una opción que ha demostrado ser una técnica efectiva para la eliminación de compuestos de difícil degradación y en muchos casos el cometabolismo ha demostrado ser una alternativa viable.

Este trabajo de tesis pretende contribuir al estudio sobre la caracterización de la degradación de TBA por poblaciones bacterianas, previamente usadas para la degradación del MTBE.

El bio-reactor se inoculó con la *Pseudomonas aeruginosa* que se aisló de sitios contaminados con gasolina. Esta fue capaz de realizar la biodegradación de MTBE por cometabolismo, utilizando pentano como fuente principal de carbono y energía. Durante un periodo de 150 días el bio-reactor se alimentó con TBA y pentano; y se obtuvo una capacidad de eliminación con pentano de 20 mg/L/h; posteriormente se probó que el pentano no era necesario y se suspendió la alimentación, en este caso la capacidad de eliminación fue de 50 mg/L/h.

Los resultados mostraron que la población microbiana fue capaz de eliminar TBA por vía cometabólica sin embargo después de un periodo de operación, la población evolucionó de tal manera que la degradación de TBA por metabolismo directo fue posible, observándose que la máxima tasa de degradación sin pentano fue de 180 mg/g/h.

La evolución en la población microbiana pudo comprobarse mediante la técnica de DGGE (Density-Gradient Gel Electrophoresis).

ÍNDICE

1. INTRODUCCION	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Contaminación atmosférica	4
2.2 El MTBE y TBA en la gasolina	5
2.3 Propiedades del MTBE y TBA	6
2.4 Contaminación por MTBE y TBA	6
2.5 El MTBE en México y problemática de contaminación	8
2.6 Toxicidad	8
2.7 Efectos del MTBE y TBA en animales y humanos	9
2.8 Biodegradación	10
2.9 Biodegradación de MTBE	11
2.9.1 Cometabolismo	11
2.9.2 Metabolismo directo	13
2.10 Ruta de degradación de MTBE y TBA	15
2.11 Tratamientos biológicos	19
2.11.1 Tratamientos “ <i>Ex – situ</i> ”	20
2.11.2 Biofiltros	20
2.11.3 Columnas de suelo	21
2.11.4 Bio-reactor de membrana	22
2.11.5 Reactores de lecho fluidizado	22
2.11.6 Tratamientos “ <i>In-situ</i> ”	22
2.11.7 Bio-barreras	23
3. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION	25
4. OBJETIVOS	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1 Poblaciones microbianas	28
5.1.1 Población degradadora de MTBE por cometabolismo	28
5.1.2 Medio de cultivo utilizado	29

5.2	Descripción de los sistemas experimentales	29
5.2.1	Descripción de lecho empacado 20L	29
5.2.2	Microcosmos	31
5.3	Caracterización del reactor	31
5.4	Condiciones de operación del reactor	32
5.4.1	Flujos de aire	32
5.5	Inicio de la operación con TBA	32
5.6	Variación de las cargas de TBA bajo condiciones de cometabolismo	33
5.7	Operación del reactor con TBA como única fuente de carbono y energía	33
5.8	Caracterización de las poblaciones microbianas	33
5.8.1	Cinéticas	33
5.8.1.1	TBA	33
5.9	Técnicas de Biología Molecular	34
5.9.1	Extracción del DNA del consorcio	34
5.9.2	Reacción de PCR	35
5.9.3	Análisis poblacional por DGGE	35
5.9.4	Separación de los productos de PCR mediante la técnica de DGGE	36
5.10	Técnicas cromatográficas	36
5.10.1	MTBE y TBA	36
5.10.2	CO ₂	37
5.11	Determinaciones analíticas	37
5.11.1	Curvas patrón para MTBE, TBA y CO ₂	37
5.11.2	Cuantificación de proteína	37
5.12	Definiciones y fórmulas	38
5.12.1	Carga	38
5.12.2	Capacidad de eliminación	38
5.12.3	Producción de CO ₂	38
5.12.4	Eficiencia de eliminación	38
5.12.5	Tiempo de residencia (EBRT)	38
5.12.6	Tasas de degradación específicas	39
6	RESULTADOS Y DISCUSION	40

6.1	Operación del reactor de TBA	40
6.1.1	Caracterización de la operación en el bioreactor	41
6.2	PCR-DGGE	47
6.2.1	Extracción de DNA	47
6.2.2	Reacción de PCR	48
6.3	Montaje de la técnica de DGGE	48
6.3.1	PCR	49
6.3.2	DGGE	49
7	DISCUSIÓN	50
8	CONCLUSIONES	53
9	BIBLIOGRAFÍA	54
10	ÁPENDICE	59

TABLAS Y FIGURAS

Tablas

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del MTBE y TBA	5
Tabla 2. Estudios de degradación biológica para MTBE y TBA	16
Tabla 3. Composición de Medio Mineral	29
Tabla 4. Características de los reactores de lecho empacado	32
Tabla 5. Condiciones de reacción	34

Figuras

Figura 1. Ruta de degradación para MTBE	15
Figura 2. Esquema de operación de bio-reactor de lecho empacado	30
Figura 3. Botellas serológicas con válvulas mininert empleadas para llevar a cabo microcosmos bajo condiciones controladas	31
Figura 4. DNA genómico proveniente del bio-reactor	47
Figura 5. Muestra amplificada por PCR para técnica de DGGE	48
Figura 6. DGGE de las poblaciones presentes en el bio-reactor al final de la operación.	49

Gráficas

Gráfica 1. Comportamiento del bio-reactor con TBA, MTBE y pentano	40
Gráfica 2. Capacidad de eliminación de TBA con pentano	41
Gráfica 3. Caracterización cinética de la población proveniente del bio-reactor de TBA	42
Gráfica 4. Cinética de producción de CO ₂	43
Gráfica 5. Cinética de consumo de TBA	44
Gráfica 6. Cinética de tasas de consumo de TBA	45
Gráfica 7. Degradación de TBA sin pentano en el reactor	46

1. INTRODUCCION

Actualmente México presenta un problema muy serio vinculado a la contaminación ambiental; esto se debe a un incremento de la población que ha alcanzado los 106 millones de habitantes; de acuerdo con la Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales (INEGI, 2009) las principales fuentes de contaminación del aire se deben a vehículos automotores e industrias. Los primeros contribuyen con el 84% de las emisiones totales. Los contaminantes atmosféricos más frecuentes y más ampliamente dispersos son el monóxido de carbono, el dióxido de azufre, los óxidos de nitrógeno, el ozono, el dióxido de carbono, además de compuestos volátiles que contribuyen a la formación de ozono.

Las autoridades mexicanas iniciaron la lucha contra la contaminación atmosférica implementando el programa PICCA (Programa Integral contra la Contaminación Atmosférica) en 1991. Este programa incluye nuevas normatividades para la industria y los servicios, la utilización del programa “Hoy no circula” y doble no circula, el programa de verificación vehicular, así como la normatividad de las gasolinas (SEMARNAT, 2002).

El uso creciente de las gasolinas oxigenadas ha generado otro tipo de problema. El MTBE se libera al ambiente por fugas de los tanques de almacenamiento subterráneos, por derrames y evaporación durante la obtención y transporte de oxigenantes o gasolina reformulada con éstos. También contribuyen los accidentes ocasionados durante el transporte de gasolina a través de tuberías subterráneas; y esto aunado a las propiedades físicas y químicas del MTBE ha causado contaminación, principalmente, en mantos freáticos (EPA, 1994).

Se ha encontrado que existen métodos efectivos para remediar los sitios contaminados, entre ellos se encuentra que la bioremediación es el uso de seres vivos para restaurar ambientes contaminados, en donde se utilizan microorganismos que son capaces de consumir a los compuestos contaminantes, con relación a la degradación del MTBE se ha probado el uso efectivo de microorganismos que pueden eliminarlo por cometabolismo, ya que

muy pocos son capaces de emplearlo como única fuente de carbono y energía.

Las poblaciones que son capaces de degradar este compuesto mediante metabolismo directo presentan características de bajo rendimiento celular y tasas de propagación lentas. Se ha reportado consorcios muy estables en cuanto a actividad para la degradación de MTBE; pero al realizar los aislamientos pierden actividad o simplemente su aislamiento es muy difícil.

En muchos sitios contaminados con MTBE, su degradación no es completa y se puede encontrar al TBA como subproducto. El TBA tiene características semejantes a las del MTBE excepto por su volatilidad y su mayor solubilidad, pero también se le considera un contaminante recalcitrante.

Para que un sitio se considere biorremediado y libre de contaminantes, la degradación de MTBE debe ser completa sin acumulación de TBA.

En esta tesis se estudia la degradación de TBA por poblaciones bacterianas previamente expuestas a MTBE, con la finalidad de establecer el uso potencial de esas poblaciones para la remediación de sitios contaminados con MTBE.

2. ANTECEDENTES

2.1 Contaminación atmosférica

En México a lo largo del siglo XX, la población se ha ido incrementando hasta alcanzar alrededor de 106 millones de habitantes (INEGI, 2009), este incremento así como el desarrollo tecnológico provocaron el aumento en los índices de contaminación ambiental. De acuerdo con la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT 2005), las principales fuentes de contaminación del aire en zonas urbanas se dividen en móviles (principalmente vehículos automotores) y fijas (industrias); las primeras son las responsables del 84% de las emisiones totales. En la zona metropolitana del valle de México (ZMVM), para el año 2005 existían más de 3.5 millones de automóviles en circulación.

En nuestro país los principales contaminantes atmosféricos evaluados son: SO₂, CO, NO₂, ozono (O₃), PM10 partículas suspendidas totales (PST) y plomo (Pb), SEMARNAT 2005.

Para cada uno de estos contaminantes existen normas que establecen las concentraciones máximas que no deben sobrepasarse una vez por año, lo que garantiza la protección a la salud de la población (SEMARNAT, 2002). En México se utiliza un índice conocido como Índice Metropolitano de la Calidad del Aire (IMECA), que consiste en una transformación de las concentraciones del contaminante a un número adimensional. La calidad del aire se considera satisfactoria cuando el valor IMECA está por debajo de 100, de 101 a 150 es regular o no satisfactorio, de 151 a 200 mala y de 201 en adelante se considera muy mala.

Las autoridades mexicanas iniciaron la lucha contra la contaminación atmosférica implementando el programa PICCA en 1991.

Este programa incluye nuevas normatividades para la industria y los servicios, la utilización del programa “Hoy no circula” y doble no circula, el programa de verificación vehicular, así como la normatividad de las gasolinas (SEMARNAT, 2002).

2.2 EL METIL-TER-BUTIL ETER (MTBE) Y ALCOHOL TER-BUTILICO (TBA) EN LA GASOLINA

En las últimas décadas ha existido una enorme preocupación por parte de los gobiernos, enfocados a revertir los problemas del deterioro del medio ambiente; a finales de los 70's la Agencia de Protección al Ambiente (Environmental Protection Agency, EPA) de los EE.UU. comenzó a tomar medidas encaminadas a proteger la salud pública mediante requerimientos de cambios en la formulación de la gasolina.

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 Ter-butil Éter. (Fayolle *et al.*, 2001).

Los aditivos con plomo usados hasta entonces como mejoradores del octanaje fueron eliminados y en su lugar se comenzaron a usar compuestos oxigenantes como el etanol y el Metil ter-Butil éter (MTBE). Este último 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. Debido a lo anterior el uso del MTBE se extendió profundamente en años posteriores debido a su bajo costo de producción (Stocking *et al.*, 2000).

El TBA es un compuesto oxigenado, donde no solo se puede encontrar presente como impureza sino que también puede añadirse directamente a los combustibles en asociación con el MTBE y funciona como un potenciador para reducir las emisiones de vehículos (Piveteau *et al.* 2001) (Salanitro *et al.* 1994; Steffan *et al.* 1997). El TBA es un coproducto en la fabricación del MTBE, y se puede encontrar en las aguas subterráneas como un subproducto de la degradación del MTBE. (Reinauer *et al.*, 2008).

2.3 PROPIEDADES DEL MTBE Y TBA

El MTBE es un compuesto orgánico sintético, estable, incoloro, con olor fuerte y flamable por su contenido de oxígeno.

El TBA es un compuesto oxigenado, y un subproducto en la eliminación del MTBE, es altamente soluble en agua, incoloro, poco volátil. (Fayolle *et al.*, 2001).

De acuerdo a la Tabla 1, una K_{oc} (Coeficiente de partición de carbono orgánico) baja como la del MTBE nos indica una capacidad limitada para ser absorbido, el coeficiente de absorción es una habilidad química para unirse a partículas del suelo, sin embargo, el TBA tiene una menor interacción que el MTBE con el agua y el suelo.

Con estas características físico-químicas la presencia del MTBE es frecuente en sitios contaminados con gasolina, encabezando la migración de los componentes de ésta. Lo anterior se debe a su alta movilidad y a que durante el transporte de dichos compuestos, el MTBE no es biodegradado, por esta razón se dice que es un compuesto recalcitrante. (Fayolle *et al.*, 2001).

El bajo valor en la constante de Henry para el TBA, hace que este compuesto tienda a permanecer en fase acuosa más que en fase gas, se disuelve rápidamente en agua, por lo que la porción disuelta en agua es mayor que la que se encuentra disuelta en el aire (Zhuang *et al.* 2005)

Una constante de Henry de 0.04 o mayor indica que es un compuesto químico volátil, y como se observa en la Tabla 1, a excepción del TBA los éteres son volátiles. Por esta característica éstos pueden fácilmente migrar (volatilizarse) a la atmósfera desde su estado líquido.

Tabla. 1 Propiedades fisicoquímicas del MTBE y TBA

NOMBRE QUIMICO	ALCOHOL TER-BUTILICO (TBA)	METIL TERBUTIL- ETER (MTBE)
Estructura molecular	$(\text{CH}_3)_3 \text{COH}$	$(\text{CH}_3)_3 \text{COCH}_3$
Peso molecular (g/mol)	88.15	74.12
Densidad (g/ml a 20°C)	0.79	0.74
Solubilidad en agua (mg/L)	Miscible	48000
Constante de Henry (25°C)	0.00059	0.045
Estado físico	Líquido incoloro	Líquido incoloro
Log K_{oc} (25°C) (-)	1.57	1.04
Log K_{ow} 25°C) (-)	0.35	1.20
Presión de vapor (mmHg a 25°C)	41	240

K_{oc} : Coeficiente de partición de carbón orgánico; K_{ow} : Coeficiente de partición octano-agua.

2.4 CONTAMINACION POR MTBE Y TBA

El uso creciente de este tipo de gasolinas ha generado otro tipo de problema. La contaminación de acuíferos, (EPA, 1994) como consecuencia de las características físicas y químicas del MTBE.

Entre las fuentes de liberación al ambiente se encuentran: a) fugas de los tanques de almacenamiento subterráneos, b) derrames y evaporación durante la obtención y transporte de oxigenantes o gasolina reformulada con estos, también por c) accidentes durante el transporte a través de tuberías subterráneas.

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 pozos, para abastecer alrededor del 50% del agua para beber de la ciudad. En el año de 1995 en uno de los pozos se detectó MTBE, y para 1996 la concentración había aumentado a 610 µg/L, por lo que los pozos fueron cerrados, el resultado de la investigación sobre este caso determinó que la contaminación se debió a fugas en 25 tanques de almacenamiento subterráneo.

Como consecuencia de éste y otros casos de aguas contaminadas en 1999, California determinó eliminar el uso del MTBE de la gasolina (USEPA 2000). Si bien su uso se ha prohibido debido a la recalcitración del MTBE, los sitios deben ser tratados ya que la atenuación natural no es posible. (Nava *et al.*, 2009).

Existe una alternativa de tratamiento basado en agentes biológicos, los cuales garantizan la eliminación de los contaminantes a un bajo costo y en condiciones de operación seguras.

En la actualidad, el TBA no es una prioridad para la EPA en su lista de contaminantes de aguas subterráneas, sin embargo no existe una reglamentación federal para los límites de concentración de TBA en el agua potable, aunque, algunos estados han establecido sus propios límites (Kane *et al.*, 2001). El estado de California y Nueva Jersey han propuesto los niveles de acción, de entre 12 - 100µg/L, para TBA en el agua potable (Lopes *et al.*, 2007).

2.5 EL MTBE EN MEXICO Y PROBLEMA DE CONTAMINACION

En México se han efectuado cambios en la composición de la gasolina. En el invierno de 1993, se sustituyó el tetraetilo de plomo por MTBE (9% en volumen) en la gasolina Magna Sin y es equivalente a la gasolina regular sin plomo con un índice de 87 octanos (Lacy, 1994).

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

En enero del 2000 Jaime Mariano Willars Andrade, Director General de PEMEX-Refinación, afirmó que Petróleos Mexicanos no tiene planes inmediatos para eliminar el uso de MTBE en sus gasolinas: “En las cantidades que se está usando el MTBE, los estudios científicos existentes indican que no hay ningún riesgo para la salud, pero si hay beneficios para la calidad del aire” (Shields, 2000).

El resultado de la incorporación del MTBE en la gasolina en los últimos 25 años se ha realizado con la finalidad de aumentar el índice de octanos. Y se ha traducido en la identificación frecuente de MTBE como un contaminante de las aguas subterráneas (Jonson *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2003).

2.6 TOXICIDAD

En un inicio el MTBE fue visto como un compuesto químico muy seguro debido a que su toxicidad es baja y es carcinogénico a dosis muy altas en animales de laboratorio, pero menos que otros componentes de la gasolina.

Actualmente la EPA de los Estados Unidos de América, enlista al MTBE como un posible cancerígeno: sin embargo los límites de toxicidad aún son objeto de debates.

Desde que el MTBE se detectó en concentraciones muy bajas (35 µg/L), la EPA ha recomendado mantener su concentración en agua potable por debajo de los límites de 40 µg/L (EPA, 1994).

Por otro lado, la principal fuente de exposición del TBA puede resultar de su uso como disolvente en la industria y como producto intermedio en la síntesis industrial.

El TBA se utiliza en algunos procesos de fabricación de plásticos, polímeros de resina, perfumes, removedores de pintura, insecticidas y productos farmacéuticos (Tay *et al.*, 2005), y por lo tanto puede liberarse al medio ambiente. Debido al alto potencial de exposición humana con el TBA, existe gran preocupación por los efectos en la salud que pudieran surgir (Mc Gregor *et al.*, 2005).

2.7 EFECTOS DEL MTBE Y TBA EN ANIMALES Y HUMANOS

En algunos estudios realizados con ratas, se mostró que el MTBE y el TBA son probablemente carcinógenos humanos y causan diferentes tipos de cáncer como leucemia, linfoma, y tumores malignos de riñones, testículos e hígado en animales. El MTBE causa cáncer en animales en muchos órganos y tejidos idénticos a los causados por exposición a las mismas dosis de benceno, cloruro de vinilo y 1,3-butadieno (Wilson, 2002).

Estudios en el laboratorio muestran que respirar grandes cantidades de MTBE por cortos periodos tiene efectos adversos en el sistema nervioso en fetos de los animales, hiperactividad y descoordinación y hasta convulsiones e inconciencia, en el humano se ha reportado que causa daños en el riñón (Grady, 1990; API, 1998; Mehlman, 1998).

La presencia del TBA en el medio ambiente representa una preocupación a nivel salud, ya que es ha reportado como una toxina y un carcinógeno animal (Cirvello *et al.*, 1995; Bradley *et al.*, 2002).

Otros investigadores aseguran que el efecto del MTBE y TBA en la salud de los humanos y en el ambiente dependen de la duración y frecuencia de la exposición, así como de las condiciones de salud de las personas o de las condiciones ambientales cuando la exposición a este compuesto ocurre (Celestinos, 1995).

Aunque aún no se ha comprobado que el MTBE cause enfermedades en el ser humano, cuando el agua contiene 40 partes por billón se aprecia un sabor y olor muy fuerte en el líquido, por lo que las regulaciones concernientes a la contaminación con MTBE se han incrementado al igual que las investigaciones para disminuir la contaminación causada por dicho compuesto.

2.8 BIODEGRADACION

Biodegradación se refiere a la transformación biológica de un compuesto orgánico a otra forma química. La biodegradación también podría convertir un compuesto químico inocuo en un compuesto tóxico, y así cambiar un compuesto fácilmente metabolizable en uno que es difícil de destruir; o alterar la toxicidad de un compuesto para que éste actúe contra otros organismos. (Acuña, 1999), lo cual no es deseable.

Los compuestos orgánicos son frecuentemente clasificados como biodegradables, persistentes o recalcitrantes. La clave para asegurar la eliminación de las sustancias orgánicas del ambiente es la evaluación real de su susceptibilidad a la mineralización (conversión a dióxido de carbono, agua y varias formas orgánicas), lo cual se logra como consecuencia de la actividad microbiana.

2.9 BIODEGRADACIÓN DE MTBE

En la década de los 90's muchos de los reportes indicaron que la biodegradación de MTBE no era posible; ya que las estructuras químicas de los oxigenantes sugerían que posiblemente eran recalcitrantes a la biodegradación.

Así, el carbono terciario presente en moléculas del MTBE y ETBE, los hacían invariablemente resistentes a la biodegradación. Además el enlace éter es muy estable, Sulfita & Mormile, 1993 confirmaron que el enlace éter es un impedimento para la biodegradabilidad de un compuesto químico.

A partir de esa fecha, surgieron reportes acerca de la biodegradación del MTBE en condiciones aerobias pero existen muy pocos reportes sobre la degradación de TBA ya que la estructura de tert-butilo, con tres grupos metilos unidos a un carbono terciario, tiende a hacerlo más resistente a la degradación biológica.

2.9.1 Cometabolismo

Un caso particular de metabolismo es denominado cometabolismo. El término cometabolismo se define como la transformación de un compuesto que no sirve como sustrato, por células en crecimiento en la presencia obligada de un sustrato de crecimiento u otro compuesto transformable, o por células en reposo en la ausencia de un sustrato de crecimiento.

Un compuesto que no sirve como sustrato es definido como aquél que no puede servir como única fuente de carbono y energía para un cultivo puro. Un sustrato de crecimiento se define como un donador de electrones que proporciona poder reductor y energía para el crecimiento celular y mantenimiento.

Muchas enzimas cometabólicas y cofactores son inducidos por el sustrato de crecimiento, aunque los agentes cometabólicos pueden también ser inducidos por otros factores, o pueden producirse constitutivamente. Un sustrato de energía se define como un donador de electrones que proporciona poder reductor y energía, pero que no soporta el crecimiento por si mismo (Criddle, 1993; Grady, 1985).

Se han identificado varios microorganismos aeróbicos, incluyendo bacterias y un hongo, capaces de degradar cometabólicamente al MTBE. También han sido identificados varios sustratos que pueden ser usados para estimular la biodegradación del MTBE.

Hyman *et al.*, 1998 compararon los estudios realizados a una especie de hongo, *Graphium* sp., el cual utiliza como sustrato primario butano para degradar cometabólicamente MTBE, a una velocidad de 0.12 mgMTBE/gproteína/h (23 nmol/min/gproteína). Se determinó que en la degradación de MTBE el hongo utiliza el citocromo P-450, para iniciar la oxidación de MTBE y de los n-alcanos al mismo tiempo, durante este proceso se detectó ter-butyl formato (TBF) y TBA. Por otro lado, la realización de estudios con la bacteria *Mycobacterium vaccae* la cual se comparó con *Graphium* sp. Se demostró que la bacteria no utiliza el citocromo P-450 para iniciar la oxidación de MTBE en presencia de propano, sin embargo, al igual que en la degradación del hongo también se detectó TBF y TBA. Y la presencia de alquinos (acetileno y propino) en bajas concentraciones inhibió la degradación de MTBE, tanto en la enzima citocromo P-450 como en el caso de *Mycobacterium vaccae*.

Garnier *et al.*, 1999 estudiaron la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, para biodegradar al MTBE en presencia de pentano, a nivel de microcosmos adicionando 10 microlitros de MTBE y 14 microlitros de pentano, obteniendo una velocidad máxima de degradación para el MTBE de 20 mgMTBE/gproteína/h (3.9nmol/min/mgproteína).

Sin embargo se observó un decaimiento en la tasa de degradación de MTBE después de 60 horas, cuando el pentano se había consumido completamente. Se determinó que la mineralización de MTBE fue del 20%, en este experimento no se hizo el monitoreo de TBA.

En estudios posteriores reportaron que la degradación de TBA solo puede llevarse a cabo en presencia de pentano.

Garnier *et al.*, 2000 reportaron un consorcio que fue capaz de llevar a cabo la biodegradación de MTBE (por cometabolismo) en presencia de pentano. De acuerdo a la experimentación realizada al probar diferentes compuestos entre ellos hexano, heptano y pentano para cometabolizar MTBE, determinaron que el pentano fue el mayor precursor para la degradación de MTBE, pues obtuvieron la mayor velocidad de degradación de MTBE hasta en 200 µg/día, sin embargo al ser consumido totalmente el pentano la degradación de MTBE se detuvo, pero al adicionar más pentano a los microcosmos el MTBE se consumió totalmente; este estudio mostró la actividad cometabólica de los microorganismos, debido a trabajos realizados previamente por los mismos autores se infiere que los microorganismos involucrados en la biodegradación de MTBE podrían ser de la especie *Pseudomonas aeruginosa*.

Smith *et al.*, 2003 estudiaron al microorganismo *Mycobacterium vaccae* JOB5 crecido en propano, e incubado con MTBE, se observó que durante el proceso de degradación hubo una acumulación de TBF que se degradó en un tiempo promedio de 100 minutos, y TBA que se degradó en un tiempo promedio de 300 minutos, teniéndose en cuenta un consumo de MTBE de 0.068 mgMTBE/gproteína/h (13 nmol/min/gproteína).

Smith *et al.*, 2003 realizaron estudios con *Pseudomonas mendocina* KR-1, los resultados mostraron que las *Pseudomonas* crecían en tolueno, n-alcanos (C5 a C8), alcoholes (C2 a C8) e iso-alcanos (C4 a C6). Entre los compuestos antes mencionados se estudió el uso de n-pentano para cometabolizar MTBE, se observó entonces acumulación de TBA. Después de un determinado período, el MTBE fue consumido completamente, pero no mineralizado en su totalidad, teniéndose una velocidad máxima de degradación de MTBE de 322 mg/gproteína/h (61.1 nmol/min/mgproteína).

2.9.2 Metabolismo directo

Es el proceso en el cual el compuesto degradado sirve como sustrato de crecimiento para el (los) microorganismo (s) involucrados en la biodegradación. El grado de mineralización del sustrato se mide en base a su conversión hasta CO₂ y la presencia de intermediarios. (Steffan *et al.*, 1997)

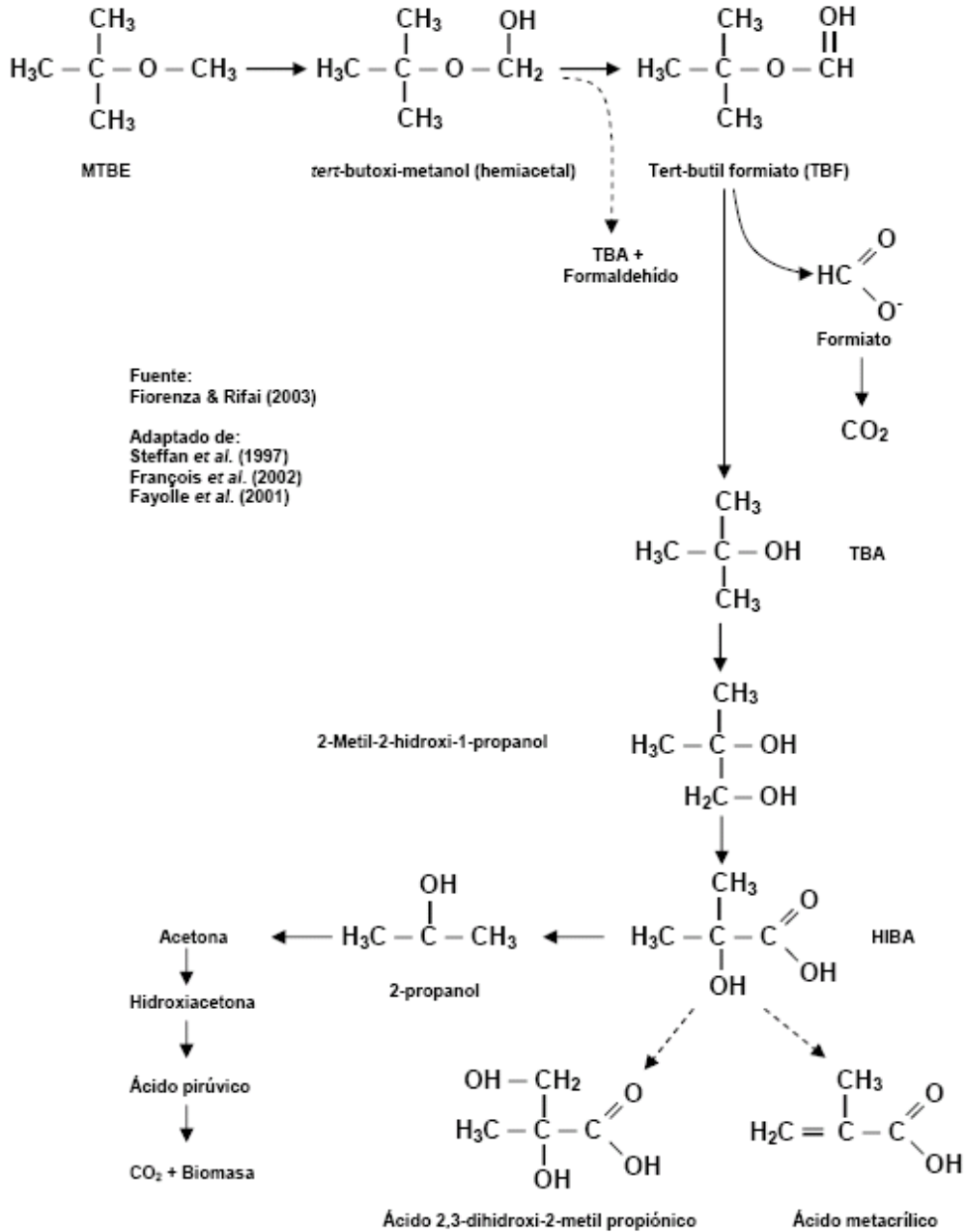
Los estudios sobre el microcosmos en laboratorio han encontrado que el TBA es la limitante de la biodegradación de MTBE. (Hatzinger *et al.*, 2001; François *et al.*, 2003). Estudios realizados han demostrado que, el TBA se metaboliza más lentamente que el MTBE, y en algunos casos, la biodegradación de TBA sólo es posible mediante la reducción de las concentraciones de MTBE (Salanitro *et al.*, 1994; Steffan *et al.*, 1997; Fayolle *et al.*, 2001).

En la Figura 1 se muestra la ruta metabólica para la degradación del MTBE propuesta por Steffan *et al.*, 1997 donde evaluaron la capacidad de bacterias oxidantes de propano, para degradar MTBE, ETBE y TAME en estudios de laboratorio. Las cepas probadas fueron *Micobacterium vaccae* JOBS (ATCC29678), ENV420, ENV421, ENV425 (ATCC55798), *Pseudomonas putida* CAM, *Rhodococcus rhodochrous* 116, *Pseudomonas oleovorans* Gpo1 y *Pseudomonas mendocina* KR1.

Todas las cepas probadas fueron capaces de degradar MTBE después de crecer previamente en propano. Sus resultados mostraron que todas las cepas propano-oxidantes probadas degradaron 20mg/L de MTBE en un rango de velocidades entre 30.9 y 9.2 nmol/min*mg de proteína después de crecer en propano.

La ruta de degradación de MTBE inicia por el ataque de una enzima monooxigenasa (citocromo P-450), al enlace entre el oxígeno y el grupo metilo contenido en el MTBE. En el primer paso de la reacción el MTBE se transforma a formaldehído y TBA, el cual puede ser convertido a 2-metil-2-hidroxi-1-propanol (MHP) y en ácido 2-hidroxiisobutírico (HIBA), algunos otros intermediarios que han sido detectados después de haberse formado el (HIBA) son 2-propanol y acetona, finalmente estos compuestos son metabolizados hasta obtener CO₂. (Ver Figura 1)

2.10 Ruta de degradación del MTBE y TBA



Fuente:
Fiorenza & Rifai (2003)

Adaptado de:
Steffan et al. (1997)
François et al. (2002)
Fayolle et al. (2001)

Figura. 1 Ruta de degradación para MTBE, por Steffan et al., 1997

Existen muchos estudios enfocados en la degradación cometabólica y no cometabólica del MTBE y otros oxigenantes, debido a su toxicidad, y los daños al ambiente; los estudios realizados se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Estudios de la degradación biológica de MTBE y TBA.

Microorganismo	Tasa de degradación del MTBE	Notas	Referencias
DEGRADACIÓN DIRECTA			
MC-100 cultivo mixto o BC1	12.88 nmol/min/mgproteína	Yx/s = 0.21-0.28 mg de peso seco/mg MTBE	Salanitro <i>et al.</i> , 1994
PM1	1.3×10^{-2} , 2.2×10^{-1} , 6.74×10^{-1} nmol/min/ml	Biomasa inicial=5,50,50 0 mg/l Y X/S=0.18	Hanson <i>et al.</i> , 1999
Cultivo mixto	2.08 y 4.17 mol/min/mg proteína	Yx/s = 0.09-0.12 mg de peso seco/ mg MTBE Original del cultivo trickling reactor	Fortin y Deshusses 1999a

<i>Hydrogenophaga flava</i> ENV 735	86 mol/min/mg proteína	MTBE inicial= 25mg/l Yx/s=0.4	Hatzinger <i>et al.</i> , 2001
<i>Mycobacterium astroafricanum</i>	20 nmol/min/mgproteína	Yx/s = 0.44mg/mg MTBE	Francois <i>et al.</i> , 2002
DEGRADACIÓN COMETABÓLICA			
Cepa ENV425	4.6 nmol/min/mg proteína	Crecimiento compuesto: propano Oxigenante cometabolizado: MTBE, ETBE, TBA y TAME	Steffan <i>et al.</i> , 1997
Cepa ENV421	9.2 nmol/min/mg proteína	Crecimiento compuesto: propano Oxigenante cometabolizado: MTBE, TBA, ETBE.	Steffan <i>et al.</i> , 1997
<i>Pseudomona putida</i> CAM	0.4 nmol/min/mg proteína	Crecimiento compuesto: alcanfor	Steffan <i>et al.</i> , 1997
<i>Graphium</i> sp.	0.33 nmol/min/mg proteína CC = 0.04 mg MTBE/mg butano	Crecimiento compuesto: n-butano Oxigenante cometabolizado:	Hardison <i>et al.</i> , 1997

		MTBE, TBA	
<i>Xanthobacter</i> sp.	51 nmol/min/mg proteína	Crecimiento compuesto: propano Km = 2.4 mM Vmax = 51 nmol/min/mgpro teína.	Hyman <i>et al.</i> , 1998
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	15.0 nmol/min/mg proteína 14.9 nmol/min/mg proteína	Crecimiento compuesto: butano. Crecimiento compuesto: 2- metilbutano	Hyman y O' Reilly 1999
<i>Pseudomona mendocina</i>	4.0 nmol/min/mg proteína	Crecimiento compuesto: 2- metilbutano	Hyman y O' Reilly 1999
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	3.9 nmol/min/mg proteína CC = 0.7-0.4 mgMTBE/mg Pentano	Crecimiento compuesto: pentano Ks =2.1 mM Yx/s = 0.9	Garnier <i>et al.</i> , 1999
<i>Rhodococcus</i> sp. CT2	11.7 nmol/min/mg proteína. 18.3 nmol/min/mg proteína. 4.6 nmol/min/mg proteína	Crecimiento compuesto: propano Crecimiento compuesto: pentano Crecimiento compuesto: isobutano	Hyman <i>et al.</i> , 2000

<i>Arthrobacter</i> (ATCC27778)	6.78 nmol/min/mg proteína 0.002 nmolTBA/min/mg proteína	Crecimiento compuesto: butano Ks = 0.024 mM Vmax = 6.78* mmol/min/mg proteína	Liu <i>et al.</i> , 2001
<i>Gordonia terrae</i>	14 nmol/min/mg proteína.	Crecimiento compuesto: etanol Oxigenante cometabolizado: MTBE, TBA, ETBE	Hernández- Pérez <i>et al.</i> , 2001
<i>Mycobacterium</i> <i>austroafricanum</i> IFP2012	315 nmol/h/g proteina	Biomasa inicial 200g/L	Francois <i>et</i> <i>al.</i> , 2002
<i>Mycobacterium</i> <i>vaccae</i> JOB5	13 nmol/min/mg proteína	Crecimiento compuesto: propano Ks = 1.36 mM Vmax = 24.4 nmol/min/mg proteína	Smith <i>et al.</i> , 2003a
<i>Pseudomonas</i> <i>mendocina</i> KR-1	61.1 nmol/min/mg proteína	Crecimiento compuesto: n- alcanos (C5-C8)	Smith <i>et al.</i> , 2003b

		<p>$K_s = 12.95 \mu\text{M}$ $V_{\text{max}} \text{ (media)} = 61.1$ $\text{nmol/min/mg proteína.}$ Oxigenante cometabolizado: MTBE, TBA</p>	
M1-P <i>Pseudomonas consortium</i>	<p>22 nmolgasolina/min/mg proteína. 9.2 nmol/MTBE/min/mg proteína. CC = 1+/- 0.04mgMTBE/mgpentano</p>	<p>Crecimiento compuesto: pentano Original de los cultivos de hidrocarburos de suelos contaminados. $Y_{x/s} = 0.45$</p>	Morales <i>et al.</i> , 2004
<i>Pseudomonas putida</i> GPo1	<p>38.9 nmol/min/mg proteina Con (DCPK) 19.7 nmol/min/mg proteina n-octano-G4 medium</p>	<p>Crecimiento compuesto: octano Medio rico con DCPK inductor $K_s = 20-40 \text{ mM}$</p>	Smith y Hyman 2004
<i>Pseudonoma aeruginosa</i>	7.5 mg/g/h	Biomasa inicial de 20mg proteína /L	Morales <i>et al.</i> , 2009
<p>a Calculado el valor de los datos publicados, en el supuesto de un 50% de contenido de proteínas de células. CC= coeficiente cometabólico.</p>			

Aunque todos los estudios mencionados anteriormente se han centrado en la degradación de MTBE poco se ha profundizado y se ha investigado en lo relativo a la degradación de TBA.

2.11 TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS

La mayoría de los métodos biológicos reportados para la eliminación del MTBE hacen uso de las reacciones microbianas para degradar los compuestos tóxicos. En general los microorganismos utilizados se encuentran en la naturaleza y en mayor proporción en los sitios donde existe contaminación ambiental como suelos contaminados con derrames de petróleo. Los compuestos de interés particular deben ser biodegradables y no tóxicos para los microorganismos de forma que se logre una mayor remoción por compuestos de bajo peso molecular y compuestos orgánicos altamente solubles.

2.11.1 Tratamientos “*ex-situ*”

La bio-remediación *ex-situ* consiste en extraer el agua contaminada con MTBE y tratarla en un determinado sistema de degradación con condiciones controladas, tales como adición de nutrientes, flujo de oxígeno y velocidad de alimentación de agua contaminada. La remoción biológica de los éteres se ha llevado a cabo desde nivel laboratorio hasta nivel campo, usando diferentes tipos de bio-reactores. Pero generalmente se utilizan biorreactores de biopelícula fija, para la remoción de MTBE.

2.11.2 Biofiltros

La biofiltración es una tecnología biológica que remueve contaminantes del aire. Esta tecnología empezó a usarse en 1920 para eliminar malos olores provenientes de las aguas de desecho de las plantas de tratamiento. En los 80's los usos de la biofiltración llevaron a aplicarse para la remoción de compuestos orgánicos volátiles (COV). Estos sistemas están empacados por lechos donde se encuentran inoculados microorganismos, los cuales se encargan de remover los COV que son transportados por un flujo de aire. La corriente gaseosa que se hace pasar a través de un lecho-húmedo y los contaminantes presentes en la fase gaseosa se sorben en el medio filtrante y en biopelícula que se desarrolla en su superficie, los contaminantes se degradan.

Eweis *et al.*, 1997 estudiaron un biofiltro para el tratamiento de corrientes de aire contaminado con MTBE y otros hidrocarburos. Se obtuvo en estado estacionario una eficiencia del 90%, y una capacidad de eliminación de MTBE entre 6-8 g/m³/h. En este sistema el MTBE fue utilizado como única fuente de carbono.

En ese trabajo se probó el efecto de la presencia de tolueno (70 ppm) sobre la capacidad de eliminación de MTBE en el biofiltro, observándose con esto una caída en la eficiencia de remoción para ambos compuestos hasta en un 70 % (Eweis *et al.*, 1997).

Church *et al.*, 1999 realizaron experimentos en columnas empacadas con suelos de cuatro sitios diferentes, extraídos de acuíferos contaminados con MTBE. Se determinó que las columnas biodegradaron al MTBE en concentraciones de 100 µg/L sólo en ausencia de BTEX, sin embargo, durante la fase de adaptación en un período de 35 días, hubo acumulación de TBA sin tener evidencia posterior de su degradación.

Hasta el momento, el trabajo de Fortin y Deshusses, 1999 es el que ha obtenido una mayor capacidad de eliminación, en ese trabajo se montaron dos biofiltros de escurrimiento que tuvieron un periodo de adaptación de 6 meses,

alcanzando en este lapso una capacidad de remoción de hasta $50 \text{ g}_{\text{MTBE}}/\text{m}^3/\text{h}$, con una eficiencia de eliminación del 97%.

En estos sistemas no se observaron intermediarios tales como Tert-butil formiato (TBF) o TBA durante la degradación del MTBE. Los autores sugieren que la clave para la degradación del MTBE es lograr la fijación de los microorganismos al material de empaque (Fortín *et al.*, 1999)

2.11.3 Columnas de suelo

Morales *et al.*, 2000 determinaron el comportamiento de una columna de suelo, inoculada con el consorcio utilizado por Fortín y Deshusses, para degradar al MTBE. La columna fue operada por 6 meses con un rango de cargas entre 0.1-2.5 $\text{g}/\text{m}^3/\text{h}$, con tiempos de residencia de 3.5-0.2 días, teniéndose una eficiencia de remoción del 100%.

2.11.4 Bio-reactor de membrana

Morrison *et al.*, 2002 estudiaron el comportamiento de un bio-reactor de membrana, el reactor fue inoculado con un cultivo mixto de microorganismos, teniéndose la ventaja de una completa retención de biomasa, después de un período de 150 días, la eficiencia de remoción de MTBE aumentó de 76 % a 99.95 %, esto significó una reducción en la concentración del contaminante de 1.16 mg/L

2.11.5 Reactores de lecho fluidizado

Vainberg *et al.*, 2002 determinaron el comportamiento de un reactor de lecho fluidizado empacado con carbón activado. Ahí se estudió la degradación de MTBE solo y en presencia de otros contaminantes. Este trabajo se llevó a cabo en 7 etapas, durante las cuales se probó el efecto de la adición de BTEX y TBA, sobre la remoción de MTBE. Los autores observaron que la concentración inicial de MTBE (7 mg/L), descendió a menos de 25 µg/L cuando se adicionó como única fuente de carbono y energía.

En otras etapas de operación del sistema, se envió una concentración de BTEX de 5mg/L y TBA con una concentración de 1 mg/L, observándose que las concentraciones de MTBE de 8.2-10.4 mg/L disminuyeron a menos de 20 µg/L, lo anterior significó que la presencia de otros contaminantes, no es una limitante para la disminución de la degradación de MTBE. Por otro lado, los experimentos realizados aumentando la concentración de entrada de MTBE, hasta en 336 mg/L, indicaron que hubo acumulación de TBA.

Stringfellow *et al.*, 2002 montaron un biorreactor de lecho fluidizado, para la degradación de MTBE por cometabolismo con iso-pentano, inoculando un cultivo mixto en una columna que utilizó carbón activado como soporte, durante un período de 20 días se llevó a cabo la adsorción de ambos compuestos en el empaque, después de 80 días la capacidad de eliminación fue del 96 % cuando se alimentó una carga de MTBE de 29 g/m³/h, se explica también que la presencia de tolueno, no produce poblaciones que sean capaces de degradar al MTBE y por ello se inhibe su degradación cuando el tolueno está presente en los bio- reactores (Stringfellow *et al.*, 2002).

2.11.6 Tratamientos “*in-situ*”

En los procesos de bio-remediación *in-situ*, se trata de acelerar la biodegradación natural mediante el suministro de oxígeno y nutrientes a la pluma contaminante; si el contaminante no permite el crecimiento adecuado de microorganismos, se debe agregar un sustrato de crecimiento y/o inocular microorganismos de forma periódica, los problemas más serios son la falta de oxígeno, especialmente en agua subterránea y en las capas profundas de suelo, así, la mejor manera de asegurar una buena difusión de oxígeno en los poros del suelo y agua subterránea, es implementar sistemas de inyección de aire adecuado, para hacer más eficiente la degradación del MTBE por los microorganismos (Wilson *et al* .,2002).

2.11.7 Biobarreras

Las biobarreras o barreras biológicas “*in-situ*”, constituyen una de las tecnologías de descontaminación del agua subterránea, agrupadas bajo la denominación de paredes o barreras de tratamiento, permeables, o reactivas, orientada al aislamiento y a la recuperación de sitios contaminados.

Pueden ser utilizadas simplemente como sistemas de contención en acuíferos porosos para reducir el flujo de agua contaminada a través de dichos materiales, o para inmovilizar compuestos tóxicos y peligrosos (metales, compuestos orgánicos) al interaccionar éstos con una biopelícula. Mediante esta técnica se pueden crear barreras para la eliminación de compuestos orgánicos tales como solventes clorados, compuestos volátiles no clorados y compuestos semivolátiles en aguas subterráneas y suelos saturados.

Las barreras biológicas se basan en procesos biológicos o en una combinación de procesos biológicos y físico-químicos. En el proceso de formación de una barrera biológica, se inyectan los microorganismos y solución de nutrientes gracias a lo cual se reproducen y forman una biopelícula. Éstos son los responsables de las transformaciones biológicas producidos en la biobarrera.

Los contaminantes se eliminan del agua subterránea, a medida que ésta fluye a través de la pantalla llevándose a cabo la remediación. De esta forma, los suelos, acuíferos y otros posibles receptores están protegidos de los contaminantes.

Las biobarreras se suelen usar como paredes verticales subsuperficiales; estas barreras impiden el transporte horizontal del contaminante y el flujo de agua subterránea. Su función es prevenir la migración de contaminantes en el agua subterránea. Por tanto, se puede formar una pantalla completa alrededor de un foco contaminante, o bien ser simplemente aquella pequeña zona del aislamiento, a través de la cual se canaliza la pluma de agua subterránea contaminada.

3. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

En México existen muy pocos estudios realizados a cerca de la problemática y degradación de MTBE, algunos de los estudios con los que se cuentan se han realizado en la Universidad Autónoma Metropolitana dentro de los cuales se puede mencionar el aislamiento de una cepa bacteriana de suelos contaminados con gasolina. La cepa fue identificada como *Pseudomonas aeruginosa* (Garnier *et al.*,1999); la caracterización y propagación de consorcios bacterianos capaces de degradar MTBE (López, 2005); la eliminación de MTBE en biofiltros se estudió mediante cometabolismo con hexano (Salazar,2005); otros trabajos tuvieron como finalidad la degradación de MTBE y otros oxigenantes de la gasolina por hongos filamentosos (Magaña, 2007), la biodegradación de éteres usados como aditivos oxigenados de la gasolina (González, 2005) y el trabajo antecesor de esta tesis llevó por título la eliminación de MTBE mediante un bio-reactor de lecho empacado (Munguía, 2004), donde se realizó la bioremediación del agua contaminada con MTBE, utilizando un bioreactor de lecho empacado, determinando las condiciones de operación y el comportamiento del sistema. La remoción del MTBE se llevó a cabo por cometabolismo, utilizando pentano como fuente principal de carbono y energía.

Si bien todos los estudios mencionados anteriormente se han centrado en la degradación de MTBE poco se ha profundizado en lo relativo a la degradación de TBA en biorreactores, así el objetivo de este trabajo fue profundizar en el estudio de la eliminación de TBA asociado a la degradación de MTBE con una población inicialmente usada para la degradación de este compuesto.

4. OBJETIVOS

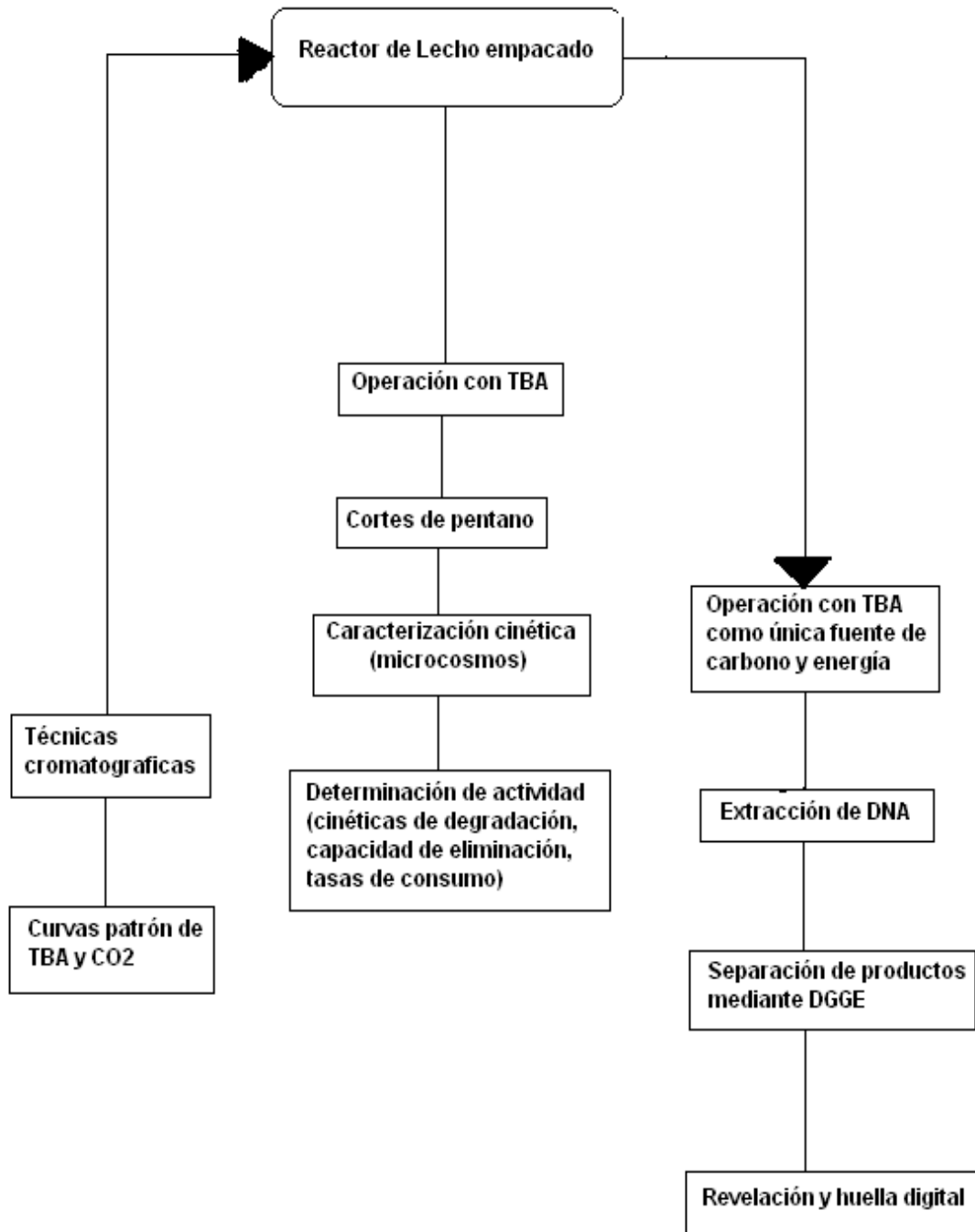
OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la degradación de TBA por poblaciones bacterianas, involucradas en la degradación de MTBE obtenidas de un biorreactor previamente usado en su degradación.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Estudiar el comportamiento de la degradación de TBA con y sin la presencia de pentano en un biorreactor
- Obtención de cinéticas de degradación de TBA y producción de CO₂ con material biológico presente en el biorreactor
- Determinación de tasas de consumo y capacidad de eliminación
- Estudiar cambios poblacionales de DGGE, basándose en el patrón de bandas

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



5. MATERIALES Y MÉTODOS

Las cinéticas se realizaron para analizar el comportamiento de degradación del TBA con pentano, para ello se monitoreo la eliminación del pentano para degradar TBA por cometabolismo y como única fuente de carbono y energía.

Se realizaron cinéticas de degradación de TBA con pentano, TBA y producción de CO₂; la degradación del reactor de TBA se estudio mediante pruebas en microcosmos; posteriormente se obtuvieron las tasas de consumo a diferentes concentraciones iniciales de TBA.

Para el estudio de ecología microbiana se utilizaron técnicas de Biología Molecular, para ello se extrajo DNA de muestra proveniente del bio-reactor y se montó la técnica de DGGE para analizar el patrón de bandas obtenidas.

5.1 POBLACIONES MICROBIANAS

5.1.1 Población degradadora de MTBE por cometabolismo

La población microbiana utilizada para la inoculación del bio-reactor, fue aislada de un consorcio obtenido de sitios contaminados con gasolina, la cual fue identificada previamente como *Pseudomonas aeruginosa*. Esta fue capaz de realizar la biodegradación de MTBE por cometabolismo, utilizando pentano como fuente principal de carbono y energía.

5.1.2 Medio de cultivo utilizado

El medio de cultivo empleado durante los experimentos fue descrito por Fortín y Deshusses 1999. Las cantidades empleadas, así como los elementos traza se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 3. Composición de Medio Mineral I

NUTRIENTES	CONCENTRACIÓN g/L	SOLUCION ELEMENTOS TRAZA	g/L
K ₂ HPO ₄	2	FeCl ₃ 6H ₂ O	0.2
KH ₂ PO ₄	1	ZnSO ₄ 7H ₂ O	1.44
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5	MnSO ₄ H ₂ O	0.84
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.1	CaCl ₂ 6H ₂ O	0.26
YNB	0.1	H ₃ BO ₃	0.062
KNO ₃	2.3	NiCl ₂ 6H ₂ O	0.09
Solución Elementos traza	5ml	Na ₂ MoO ₄ H ₂ O	0.49
Agar noble	20g	CaCl ₂ 2H ₂ O	0.17
pH	6.8-7.0	NaMoO ₄ 2H ₂ O	0.57

5.2 DESCRIPCIÓN DE LOS SISTEMAS EXPERIMENTALES

5.2.1 Reactor de lecho empacado 20 L

Este reactor operó inicialmente en la eliminación de MTBE por cometabolismo con pentano. Se empezó la alimentación con TBA para el estudio de su degradación cometabólica y posteriormente como única fuente de carbono.

El sistema experimental es un bio-reactor de lecho empacado, que consta de una columna de vidrio con cinco puertos de muestreo, distribuidos uniformemente a lo largo de la columna, dentro de ésta se establece una tabla de agua simulando la presencia del acuífero.

En este sistema se alimenta el flujo de líquido contaminado con el oxigenante en cuestión (MTBE o TBA) a tratar en la parte superior, de la parte inferior se deriva un flujo de recirculación que es tomado de la tabla de agua y que se une al flujo de alimentación; en la parte inferior y superior del sistema se tienen puertos donde se toman muestras de líquido para determinar la concentración del MTBE o TBA y su degradación, el flujo de aire para el suministro de oxígeno mezclado con pentano, se realiza por la parte inferior del sistema. Se utilizó esta configuración de bioreactor por que simula una biobarrera a nivel de campo, donde existe una zona vadosa, que es la parte superior de la columna de reactor, una tabla de agua que es la parte media de la columna; así como en la parte superior existe un compresor que se encarga de enviar el flujo de aire en la parte inferior de la biobarrera para asegurar el oxígeno para los microorganismos degradadores de MTBE y TBA.

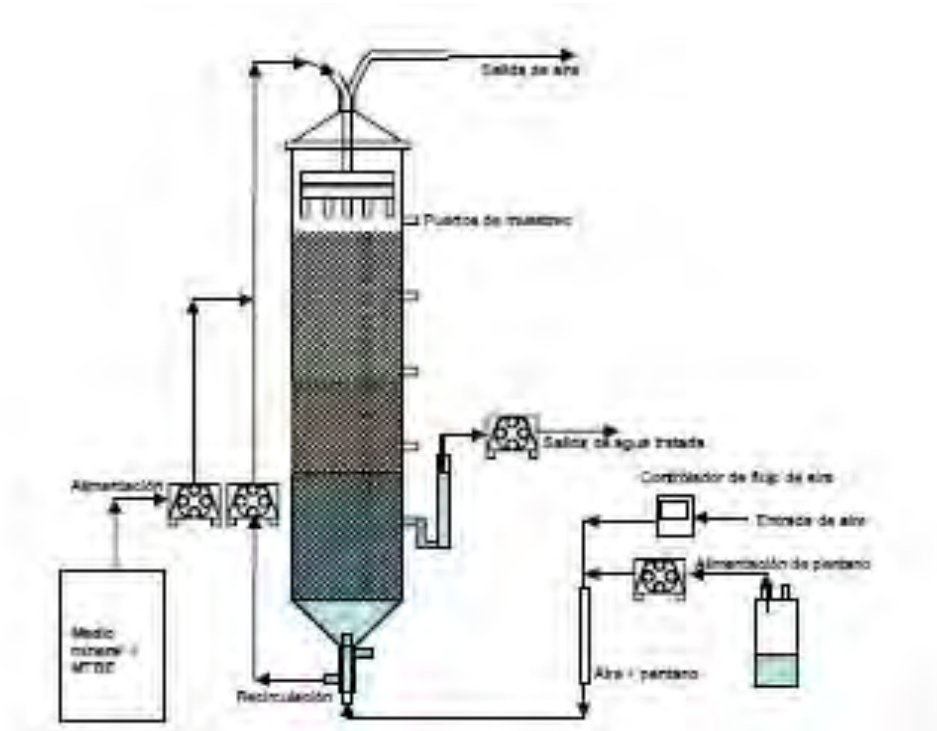


Fig. 2. Esquema de operación de bio-reactor de lecho empacado.

5.2.2 Microcosmos

El inóculo para los experimentos en microcosmos se obtuvo de muestras del reactor que se mantuvieron en microcosmos en botellas serológicas de 125ml (Fig.3) con 20ml de medio mineral con 250mg de biomasa; y 2,4,8 y 16 μ l de TBA respectivamente, pH de 7, selladas con válvulas Mininert bajo condiciones aerobias e incubadas a 30°C y 130 rpm.

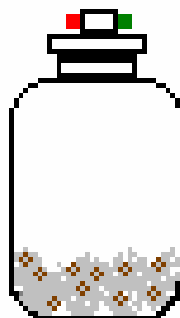


Figura 3. Botellas serológicas con válvulas mininert empleadas para llevar a cabo los microcosmos bajo condiciones controladas.

5.3 CARACTERÍSTICAS DEL REACTOR

La Tabla 4 muestra las características usadas en el reactor donde el diámetro de la columna fue de 15.9cm, el material de empaque fue de Tezontle, el volumen empacado fue de 20.8L y el volumen de la tabla de agua fue de 3.7L.

Tabla 4. Características del reactor de lecho empacado

Características	Arreglo
Diámetro de la columna	<i>15.9 cm</i>
Área del diámetro del reactor	<i>197.9 cm²</i>
Altura de la columna	<i>145 cm</i>
Material de empaque	<i>Tezontle</i>
Diámetro promedio de partícula	<i>1-0.5 cm</i>
Altura empacada	<i>115 cm</i>
Volumen empacado	<i>20.8L</i>
Masa de empaque utilizado	<i>18.7 kg</i>
Porosidad	<i>56%</i>
Altura de la tabla de agua	<i>25 cm</i>
Volumen de la tabla de agua	<i>3.7 litros</i>

5.4 CONDICIONES DE OPERACIÓN DEL REACTOR

5.4.1 Flujo de aire

El flujo de aire utilizado en el arreglo experimental, fue de 7.20 ± 0.21 L/h, donde se mantuvo el flujo de alimentación líquida de 0.3L/h y flujo de recirculación de 1.02L/h. Se procedió a determinar la máxima capacidad de eliminación, la prueba con diluciones de medio, cortes de pentano.

5.5 INICIO DE LA OPERACIÓN CON TBA

Durante la etapa de arranque de la operación del reactor con TBA se probó la degradación cometabólica durante aproximadamente 150 días y posteriormente se hicieron los experimentos de degradación directa de TBA, haciendo un total de 280 días.

5.6 VARIACIÓN DE LAS CARGAS DE TBA BAJO CONDICIONES DE COMETABOLISMO

Durante los estudios de degradación cometabólica, se variaron las cargas de TBA entre 4-50 mg/L/h con carga de pentano constante de 10 mg/L/h; para ello se varió la concentración de entrada de TBA manteniéndose constante el flujo del medio alimentado al reactor, una vez realizado el cambio de concentración se dejó que el reactor alcanzara estado estacionario.

5.7 OPERACIÓN DEL REACTOR CON TBA COMO ÚNICA FUENTE DE CARBONO Y ENERGÍA

Poco a poco la alimentación de pentano se suspendió hasta removerla por completo y se realizaron los estudios de degradación directa de TBA para ello se varió la carga de TBA alimentado entre 5-70 mg/L/h

5.8 CARACTERIZACIÓN DE LAS POBLACIONES MICROBIANAS

5.8.1 Cinética con TBA

Se realizó la caracterización cinética con muestra de la población microbiana presente en el reactor después de 150 días de operación continua con TBA y pentano observando que éste último no era necesario para la degradación de TBA. El tamaño de la muestra que se sacó para el monitoreo en microcosmos para cada botella fue de 1g de muestra.

5.9 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLÉCULAR

5.9.1 Extracción del DNA del consorcio

La extracción de ADN de la muestra se realizó con kit UltraClean Soil DNA Kit. Catalogo #12800-50 Mo Bio Laboratories, Inc., de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

5.9.2 Reacción de PCR

Los primers usados para la amplificación de los productos de PCR de la región V3-V5 del gen 16S rRNA fueron 341F (contiene el clamp GC) usado en la descripción de Muyzer et al, 1993. Y 907R (Yu&Morrison, 2004) de acuerdo a la numeración basada en el gene 16S rRNA de Escherichia coli .

El PCR se realizó en un termociclador marca (Bio Rad, My Cyclor, Hercules, CA, USA) usando 25µl de reacción. Las condiciones de reacción se describen en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de reacción.

	Volumen final de la reacción
	25µl
H ₂ O	21.125µl
HotStar Taq Buffer (10X) ⁴	2.5 µl
dNTPS (10mM)	0.5 µl
Primer 338f (43 µM)	0.25 µl
907r (50 µM)	0.25 µl
MgCl ₂ (25 µM)	0.25 µl
Templado	1 µl
HotStar Taq DNA polimerase (5U/µl)	0.125 µl

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95°C por 15 min. (desnaturalización inicial), 35 ciclos (94°C por 1 min., desnaturalización, 52°C por 1 min hibridación, 72°C por 2 min de extensión) y 72°C por 10 min de extensión final.

5.9.3 Análisis poblacional por DGGE

El ADN de las muestras previamente amplificadas mediante la reacción de PCR, fue analizado por DGGE paralelo usando el equipo DCODE de BioRad, siguiendo el procedimiento descrito primeramente por Muyzer et al., (1993).

La muestra fue depositada en la parte alta del gel de poliacrilamida al 6% utilizando un intervalo desnaturante de 30% a 60% y amortiguador TAE (50X).

El gradiente desnaturante estuvo formado por urea 7M y formamida al 40%. La electroforesis se realizó a una temperatura de 60°C durante 15 hrs a 75V.

5.9.4 Separación de los productos de PCR mediante la técnica de DGGE

Los productos de PCR tomadas de la muestra del reactor se corrieron en un gel de poliacrilamida al 6% y con un gradiente desnaturante de 30 a 60% de urea y formamida al 40%. La electroforesis se realizó a 75V y 60°C durante 15h.

Posteriormente los geles fueron teñidos con nitrato de plata. (Vease anexo), y por último, se observó a través del Fotodocumentador Gel Logic 200 Imaging System.

5.10 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

5.10.1 MTBE Y TBA

El monitoreo de la degradación efectuada por consorcios fue realizado mediante mediciones en fase líquida, para ello se utilizó un Cromatógrafo de gases modelo HP 5890 SERIES II, con columna capilar Alltech AT-1000, longitud de 10 m, diámetro interno de 0.53 mm, a una presión de operación de 5 psi y las siguientes temperaturas: Horno 80°C, inyector 130°C, detector 150°C. El cromatógrafo utilizado funciona con auto muestreador de inyección automática con un volumen de 0.5µL de muestra.

5.10.2 CO₂

La determinación de CO₂ se realizó, mediante análisis por cromatografía de gases con un cromatógrafo Gow-Mac serie 550 con una columna concéntrica CTR1 Alltech, (USA) para gases conectada a un detector de conductividad térmica. Las condiciones de operación fueron de 50°C para el inyector, 115°C para el detector y 40°C para la columna. El gas acarreador fue helio, con un flujo de 70 mL/min. El volumen de muestra inyectado fue de 100µL.

5.11 DETERMINACIONES ANALÍTICAS

5.11.1 Curvas patrón para MTBE, TBA y CO₂

Para poder cuantificar el consumo de MTBE, TBA, y producción de CO₂ se realizó una curva patrón. La curva se preparó en un rango de concentración de 0 a 60 mg/L. Estas concentraciones fueron empleadas en fase gas-líquido, en botellas serológicas de 162ml sin inóculo. Del headspace en las botellas se tomó un volumen de inyección de 100µL que se inyectó en el cromatógrafo de gases bajo las condiciones mencionadas en los métodos analíticos.

Con las áreas y concentraciones de la primera fase se ajustó una línea recta para conocer las concentraciones de MTBE en el sistema gas-líquido. (Ver anexos)

5.11.2 Cuantificación de proteína

La proteína fue medida como un estimado de masa celular. En este trabajo se utilizó la técnica de Coomassie (Sedmark *et al.*, 1977) para la cuantificación de proteína inicial y final respectivamente (Ver anexos).

5.12 DEFINICIONES Y FÓRMULA

5.12.1 Carga: Cantidad de sustrato alimentado a tratar por unidad de volumen del bio-reactor por unidad de tiempo.

Carga= (Concentración entrada) (flujo de aire)/volumen de reactor

5.12.2 Capacidad de eliminación: Es la cantidad de MTBE biodegradado por unidad de volumen de bio-reactor por unidad de tiempo.

Capacidad de eliminación = $[\Delta C] / \text{Tiempo de residencia}$

5.12.3 Producción de CO₂: Es el producto de la biodegradación de MTBE expresado en unidades de masa producidas por unidad de volumen del bio-reactor por unidad de tiempo.

Producción = (Concentración salida) (flujo de aire)/volumen de reactor

5.12.4 Eficiencia de eliminación: Es la fracción de contaminante removido por el bio-reactor, expresado como un porcentaje.

Eficiencia de remoción = $1 - \left[\frac{\text{Concentración Salida}}{\text{Concentración Entrada}} \right]$

5.12.5 Tiempo de residencia (EBRT): El tiempo de residencia representa el tiempo de permanencia de una sustancia, es decir, el tiempo que transcurre para que desaparezca totalmente por reacción o consumo.

(EBRT, de las iniciales en inglés Empty Bed Retention Time), resultante de dividir el volumen aparente del lecho entre el flujo del gas que lo atraviesa.

Tiempo de residencia = $\frac{\text{Volumen del lecho}}{\text{Flujo del gas}}$

5.12.6 Tasas específicas de degradación: Las tasas de reacción indican la cantidad de MTBE consumido por unidad de tiempo por unidad de proteína, dichas tasas de reacción son obtenidas a partir de los experimentos realizados en microcosmos, de los cuales se obtienen gráficas del consumo de MTBE con el tiempo. Los datos de degradación de los compuestos se ajustaron mediante el modelo de Gompertz. El cual es un modelo de tres parámetros, que pasa por los puntos graficados, y que determina la velocidad de consumo del contaminante a tratar con un mayor ajuste en los datos experimentales. El modelo se desarrollo por Benjamín Gompertz en 1825, y 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 = es la máxima cantidad de sustrato consumida (mg de sustrato/
microcosmos)

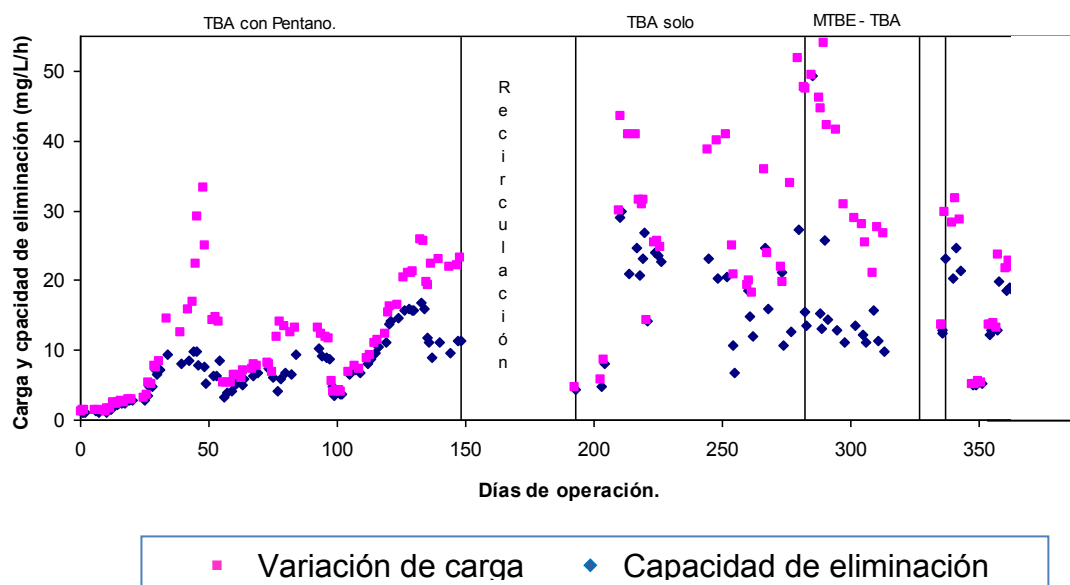
β = es el incremento del consumo de MTBE cuando el tiempo se incrementa
indefinidamente

k = es la velocidad de consumo del sustrato (1/tiempo.)

x = es el tiempo

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 OPERACIÓN DEL REACTOR TBA

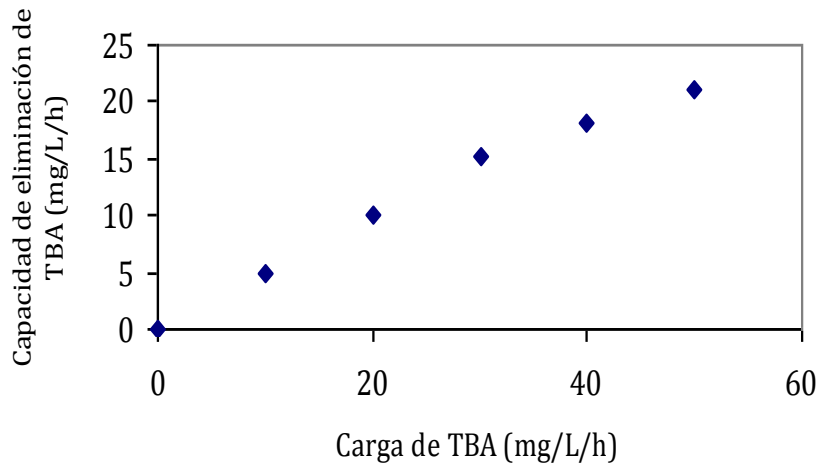


Gráfica 1. Comportamiento del reactor con TBA, MTBE y pentano

Antes de realizar este trabajo el reactor operó alrededor de 1 año en la eliminación del MTBE por cometabolismo con pentano. Posterior a ese período se inició este trabajo donde se hizo el estudio de la degradación de TBA.

En la gráfica 1 se puede observar, de manera global, la operación del reactor durante el periodo de este estudio. Inicialmente se monitoreó la actividad del TBA con pentano (degradación cometabólica) por alrededor de 150 días, variando la carga; después el reactor se mantuvo en recirculación en este tiempo se extrajo muestra del reactor y se hicieron análisis en microcosmos. Posteriormente en los días 200-280 de operación se monitoreó la actividad del TBA sin la presencia de pentano, y una vez concluida esta etapa se alimentó nuevamente MTBE para analizar la respuesta del sistema.

6.1.1 Caracterización de la operación en el bioreactor



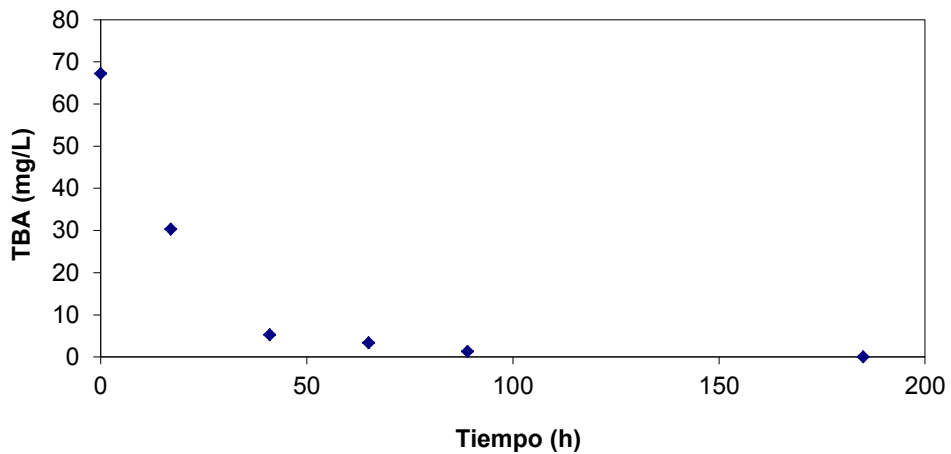
Grafica 2. Capacidad de eliminación de TBA con pentano

Resultados anteriores a este trabajo (Munguía, 2004) mostraron el comportamiento dinámico del bio-reactor con respecto a la alimentación de pentano. Se observó que la actividad del sistema empezaba a decaer en cuanto a la degradación de MTBE, después de un tiempo de 36 horas de suspendida la alimentación de pentano, disminuyendo la eficiencia de degradación hasta un 20% en un tiempo de 100 horas. Posterior de esta caída al alimentarse nuevamente pentano al sistema, la recuperación en cuanto a la capacidad de eliminación tomó un lapso aproximado de 50hrs.

De esta manera se definió una estrategia de alimentación periódica de pentano que permitiera reducir su consumo y mantener la degradación de MTBE.

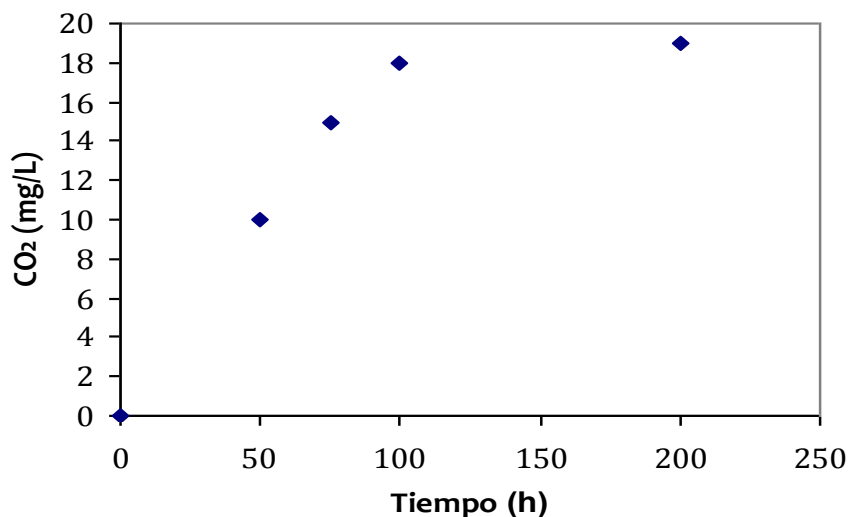
En la gráfica 2 se presenta la degradación de TBA en presencia de pentano, como se muestra en dicha figura la actividad con pentano alcanzó una máxima capacidad de eliminación de 20mg/L/h con una carga de 50 mg/L/h.

Con el antecedente de este comportamiento y una vez determinada la máxima capacidad de eliminación del biorreactor bajo condiciones de degradación cometabólica, se analizó el potencial de seguir esta misma estrategia en el reactor, para ello se extrajo material de empaque y se hicieron pruebas en microcosmos para determinar el potencial de la población microbiana para degradar al TBA como única fuente de carbono.



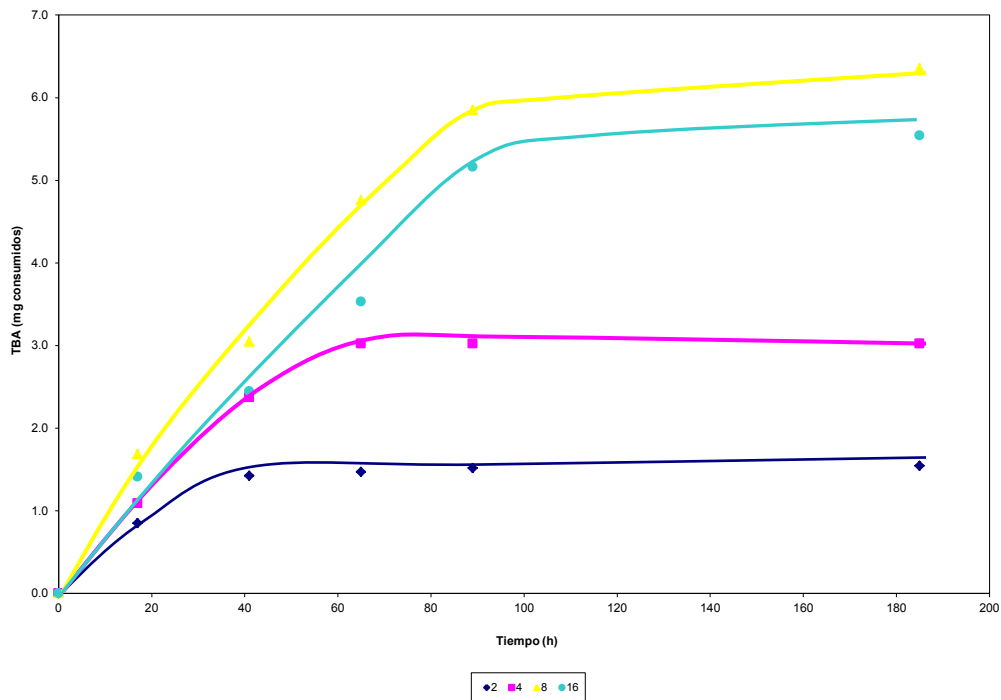
Gráfica 3. Caracterización cinética de la población proveniente del bio-reactor de TBA.

Se realizó en un tiempo de 200h, donde se tuvo una concentración inicial de 68 mg/L, en un tiempo de análisis de 30h la concentración disminuyó a menos de la mitad, en 98h ya se había degradado completamente el TBA, se siguió monitoreando hasta el tiempo 190h donde el valor fue constante.



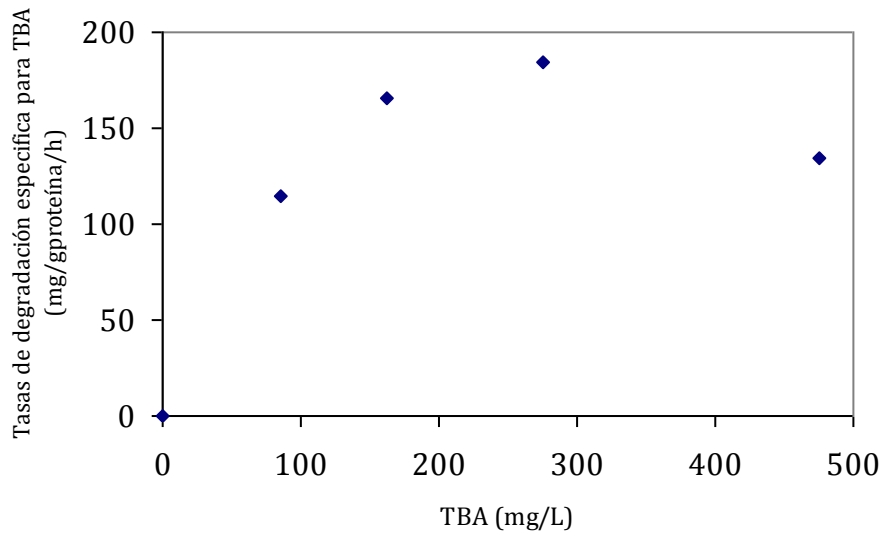
Gráfica 4. Cinética de producción de CO₂

En la cinética de producción de CO₂ que se presenta en la gráfica 4 se puede observar que el incremento en la producción de CO₂ es considerable, al tiempo 50h llegó a una concentración de 10mg/L, en 100h el CO₂ llegó a 18mg/L, en alrededor de 190 h llegó a una fase estacionaria; lo que se relaciona con la gráfica 3 donde aproximadamente en el mismo número de horas se eliminó el TBA; lo que indica una asociación directa entre el TBA degradado y el CO₂ producido.



Grafica 5. Cinética de consumo de TBA

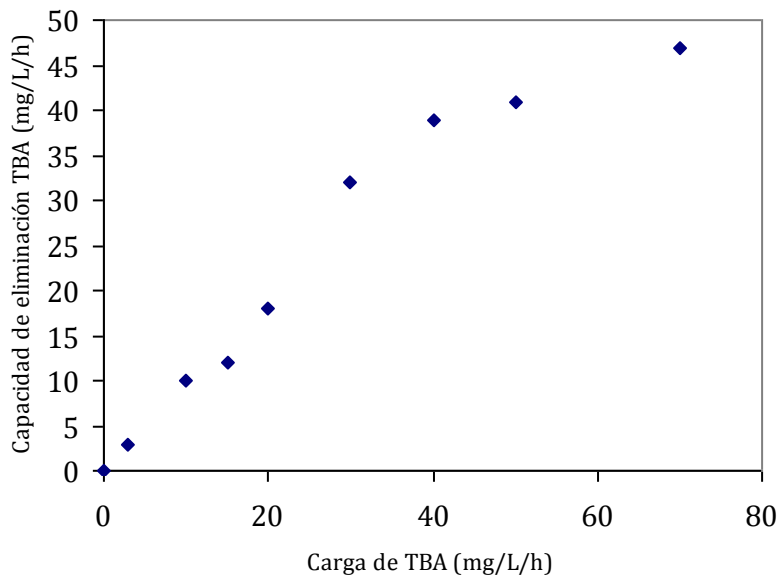
En la gráfica anterior se muestra el consumo del TBA a diferentes concentraciones 2, 4, 8 y 16 µl de TBA, respectivamente. Se puede observar que, en el tiempo 40h el TBA consumido fue 1.5 mg para el experimento donde se adicionaron 2 µl, en el caso de 4 µl se consumieron 2.3 mg y cuando 8 µl de TBA se ensayaron sólo 6.0 mg fueron consumidos y finalmente para el experimento ensayado con 16 µl se consumieron únicamente 5.5 mg. En esta gráfica se aprecia que la curva de 16 µl está por debajo de la correspondiente a 8 µl, este comportamiento puede deberse a inhibición por sustrato. A partir de las 90 h del experimento, no hubo cambios apreciables en la degradación de TBA.



Gráfica 6. Cinética de tasas de consumo de TBA

En la gráfica 6 se puede ver que las tasas de consumo ($\text{mg}/\rho_{\text{proteína}}/\text{h}$) mostraron valores entre 0 y 80 ($\text{mg}/\rho_{\text{proteína}}/\text{h}$). Las tasas de degradación aumentan para concentraciones entre 0-250mg/L, posteriormente se observó que en el último punto evaluado a 450mg/L la tasa de degradación es menor, lo cual nos indica que hay inhibición por sustrato bajo estas condiciones.

Los resultados anteriores mostraron que la degradación de TBA era posible sin el pentano y se procedió a establecer este régimen de operación en el reactor.



Gráfica 7. Degradación de TBA sin pentano en el reactor

En la gráfica 7 se puede observar que en la degradación de TBA sin pentano se obtuvo una capacidad de eliminación de 50mg/L/h con una carga de 70 mg/L/h; mientras que los valores obtenidos con pentano alcanzaron una capacidad de eliminación de 20mg/L/h con una carga de 50 mg/L/h, por lo que se comprueba que la presencia del pentano afecta negativamente la degradación de TBA bajo condiciones ensayadas con la población microbiana presente en el reactor.

Posterior a estos experimentos se alimentó al reactor con MTBE, sin embargo se observó que se había perdido la capacidad para degradarlo por vía cometabólica con pentano y se procedió a analizar la muestra del reactor utilizando técnicas de Biología Molecular que permitiera explicar este comportamiento con base a la evolución de la población microbiana presente en el reactor.

6.2 PCR-DGGE

6.2.1 Extracción de DNA

Se realizó la extracción de DNA descrita en la sección de materiales y métodos. En la figura 4 se muestra un gel de agarosa, donde en el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular de 100pb, en el carril 2 fue depositada una muestra de DNA.

6.2.2 Reacción de PCR

Se amplificó la región V3-V5 del gen 16s rDNA para bacterias por medio de PCR, usando primers universales para bacterias (ver materiales y métodos), de acuerdo a la secuenciación del gen 16s de *E. coli*.

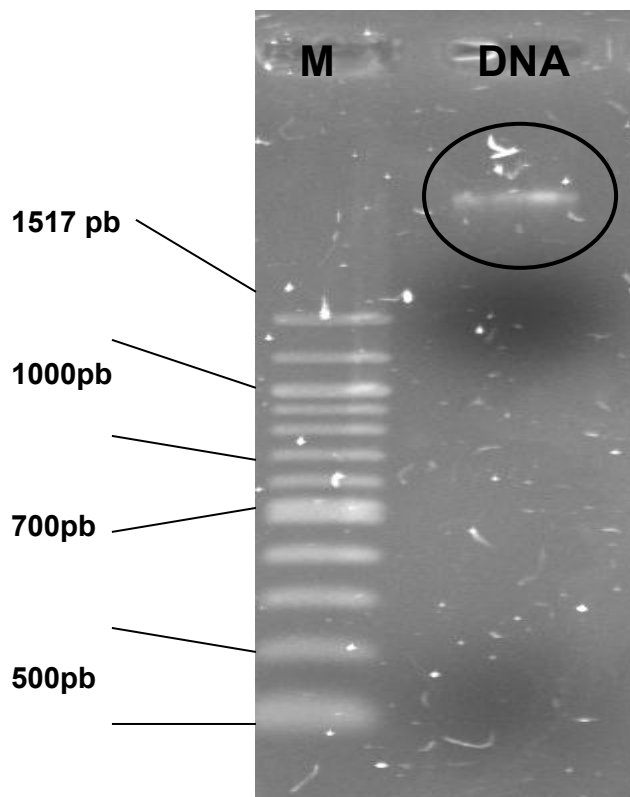


Figura 4. DNA genómico proveniente del bio-reactor. M. Marcador de peso molecular 100pb.

6.3 TÉCNICA DE DGGE

6.3.1 PCR

En la Figura 5 se muestra el producto de PCR que se utilizó para la técnica de DGGE, donde se observa que el producto de PCR es de aproximadamente 500pb, de acuerdo al marcador de 100bp; lo que indica que la muestra sometida a amplificación de la región V3-V5 para bacterias provenientes del reactor se amplificó correctamente, y por lo tanto las condiciones usadas en el cóctel de PCR, y en el Termociclador fueron las correctas.

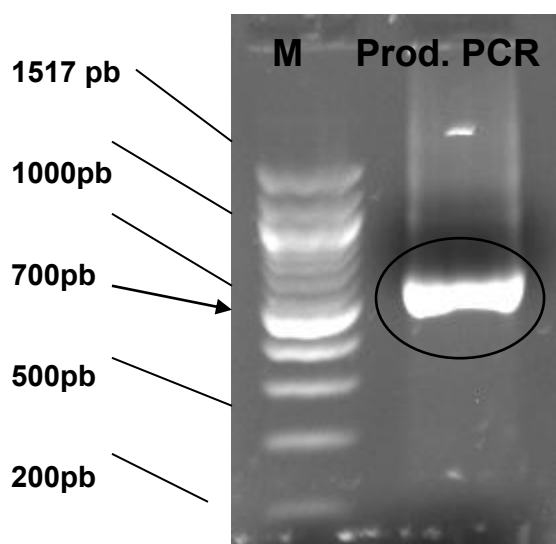


Figura 5. Muestra amplificada por PCR para técnica de DGGE. M. Marcador de peso molecular 100pb.

6.3.2 DGGE

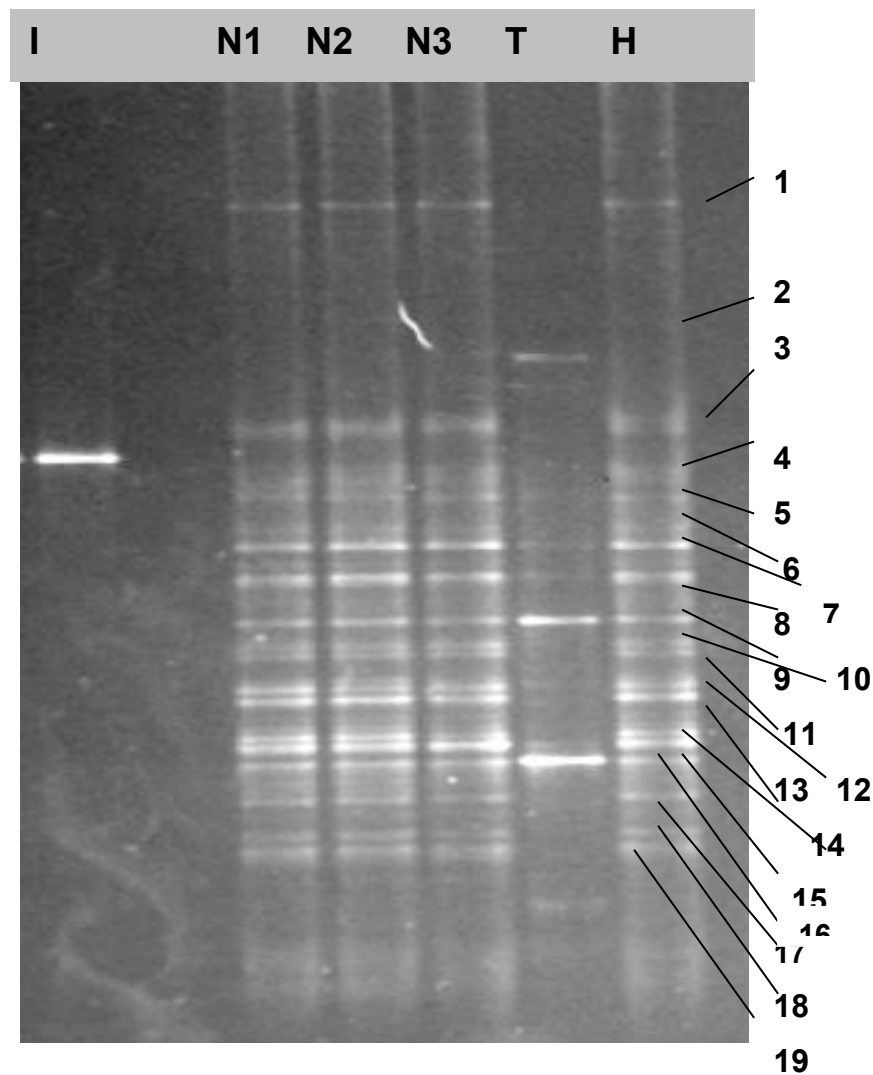


Figura 6. DGGE de las poblaciones presentes en el reactor al final de la operación. I: Inóculo, N1: nivel 1, N2: nivel 2, N3: Nivel 3, T: tabla de agua, H: muestra homogénea, gradiente desnaturizante urea 7M y formamida al 40%.

La revelación del gel del DGGE nos indica que las 19 bandas estuvieron presentes tanto en el nivel 1, nivel 2, nivel 3 y la muestra homogénea, no habiendo ninguna diferencia entre el patrón de bandas entre ellas; mientras que en la tabla de agua predominan 6 bandas de las cuales dos están más intensas y corresponden al patrón de bandas presentes en las muestras analizadas en la muestra homogénea.

7. DISCUSIÓN

La degradación por cometabolismo ha sido reportada ampliamente, la mayor parte enfocados para el MTBE, sin embargo poco se ha estudiado en TBA y la información existente es limitada.

Steffan *et al.*, 1999 reportaron una especie de *Pseudomonas* capaz de degradar MTBE a una tasa de 2.11 mg/p_{roteína}/h. no obstante, el microorganismo biotransformaba MTBE a TBA. Más tarde, Garnier *et al.*, 1999 obtuvieron una tasa de degradación de MTBE de 20 mg/p_{roteína}/h con una especie de *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, esta cepa no mineralizó al MTBE, éste se acumuló como TBA dada su tasa de degradación considerablemente más lenta de 4.25 mg/p_{roteína}/h. solo el 20% fue transformado hasta CO₂. Una tasa de degradación similar fue reportada por Hyman *et al.*, 2000 para una especie de *Pseudomonas mendocina* crecida en 2-metilpentano. En todos estos casos con *Pseudomonas*, hubo acumulación de TBA, sugiriendo que su degradación es el paso limitante en la degradación del MTBE.

Morales *et al.*, 2000 determinaron el comportamiento de una columna de suelo, inoculada con el consorcio utilizado por Fortín y Deshusses, para degradar al MTBE, la columna fue operada por 6 meses con un rango de cargas entre 0.1-2.5 g/m³/h, con tiempos de residencia de 3.5-0.2 días, teniéndose una eficiencia de remoción del 100%. Volpe *et al.*, 2009 probaron la degradación de MTBE monitoreándola durante 90 días y obtuvieron una degradación máxima de 13-20mg/L/h, estos valores se encuentran por debajo de lo citado en la literatura (Deeb *et al.*, 2000; Fortín *et al.*, 2001; Hatzinger *et al.*, 2001; Francois *et al.*, 2002; Nava *et al.*, 2007)

Hasta el momento, el trabajo de Fortin y Deshusses (1999) es el que ha obtenido una mayor capacidad de eliminación, en ese trabajo montaron dos biofiltros de escurrimiento que tuvieron un periodo de adaptación de 6 meses, alcanzando en este lapso una capacidad de remoción de hasta 50 gMTBE/g/h, con una eficiencia de eliminación del 97%.

Hay pocos trabajos con reportes de degradación por cometabolismo de TBA utilizando bacterias del genero *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 mg/g/h.

Prudent & Suidan, 2004 probaron la degradación del TBA, en presencia con benceno y obtuvieron tasas de degradación para el TBA de 43 mg/g/h.

Zhuang *et al.*, 2005 monitorearon la degradación de TBA presente en un reactor con biomasa tomada de un sitio contaminado, durante 175 días y obtuvieron una tasa de degradaron de 18.2 mg/L/h. Morales *et al.*, 2009 probaron la capacidad de degradación de MTBE y otros oxigenantes por cometabolismo, se estudio en un consorcio que contenía una *Pseudomonas*; obtuvieron una degradación de TBA de 57.1 ± 2.3 mg/L/h, con una mineralización del 100%; mientras que para MTBE fue de 7.5 ± 5 mg/L/h, con una mineralizaron del 96%.

En este trabajo se obtuvo la capacidad de eliminación por vía cometabólica en presencia de pentano de 22 mg/L/h, poco a poco la alimentación con pentano se removió hasta quedar solo con la eliminación del TBA, y el valor alcanzado en este caso fue de 50 mg/L/h. Esto nos indica que el pentano afecta la degradación del TBA.

Al comparar la capacidad de eliminación de TBA obtenidas con las del presente trabajo, encontramos que se obtuvo 50 mg/L/h, y una tasa de consumo específica de 180 mg/L/h, muy similar al trabajo de Fortin & Deshusses 1999 50 (mg/L/h) y Morales *et al.*, 2009 (57.1 ± 2.3 mg/L/h) que es el que ha obtenido una mayor tasa de degradación, lo que nos indica que la capacidad de eliminación y tasas de consumo son efectivas comparadas a las reportadas.

En cuanto a las técnicas utilizadas de Biología Molecular nos mostró una huella de 19 bandas, en donde se tiene como referencia *Pseudomonas aeruginosa*, el bandeo obtenido en la muestra homogénea nos indica que disminuyó la intensidad de la banda; ya que el bio-reactor se encontraba degradando TBA y

no MTBE, dado que la *Pseudomonas aeruginosa* es la que más se ha reportado en la degradación del MTBE.

La población inicialmente inóculada en el biorreactor era capaz de eliminar el TBA únicamente bajo cometabolismo, en el biorreactor se desarrollaron otros microorganismos que fueron capaces de degradar al TBA como única fuente de carbono y energía y que desplazaron a la población original de *Pseudomonas*. Las poblaciones microbianas que se desarrollaron en el reactor fueron ajenas al inóculo inicial y pudieron desarrollarse de los microorganismos presentes en el ambiente, ya que no se manejaron condiciones de esterilidad, todo esto era una gran oportunidad para que poblaciones de microorganismos seleccionadas fueran capaces de degradar el TBA.

7. CONCLUSIONES

Los trabajos revisados, han abordado la importancia del estudio y desarrollo de estrategias en biorremediación como la mejor opción con aplicación en el tratamiento de acuíferos contaminados con oxigenantes, utilizando cultivos de bacterias y hongos para esta solución.

Asimismo, el conocimiento adquirido a través del tiempo en estos trabajos, nos ofrece la información necesaria acerca de las limitaciones que pueden surgir ante la aplicación de bioprocesos de eliminación de oxigenantes presentes en el ambiente.

Se sabe que para que un sitio se considere biorremediado y libre de contaminantes, la degradación del MTBE debe ser completa sin acumulación de TBA. Gran parte de la literatura hace énfasis en que la eliminación de TBA no es posible y que ésta es una limitante para la degradación de MTBE; sin embargo este trabajo ha demostrado que la eliminación del TBA es completa. Las tasas de degradación y la capacidad de eliminación obtenidas en este trabajo son de los valores más altos que se han reportado en la literatura. Y por tanto respaldan el potencial mostrado por este bioreactor como una alternativa exitosa en biorremediación.

Así, los microorganismos que degradan el MTBE mediante metabolismo directo presentan características de bajo rendimiento y tasas de propagación lentas, lo cual constituye la principal limitante para ser utilizados exitosamente en la biorremediación. Sin embargo, en este trabajo no se llegó al aislamiento de las poblaciones microbianas, por lo que en estudios futuros existe la posibilidad de considerar el aislamiento y caracterización de las poblaciones presentes en el bioreactor. Además, de un estudio del tratamiento en laboratorio de aguas contaminadas con oxigenantes, seguido de una prueba en campo que pueda proveer de los datos necesarios para crear un sistema exitoso de remoción completa de los oxigenantes.

9. APENDICE A

A1. Preparación de soluciones de DGGE para tinción con nitrato de plata.

Solución fijadora 8X (para 5 geles)

REACTIVO	CANTIDAD
Alcohol absoluto	200ml
Acido acético glacial	10ml
Agua destilada	40ml

Solución fijadora 1X (para un gel)

REACTIVO	CANTIDAD
Solución fijadora 8X	50ml
Agua destilada	350ml

Solución de nitrato de plata (para un gel)

REACTIVO	CANTIDAD
Nitrato de Plata	0.4g
Solución fijadora 1x (sin usar)	200ml

Solución reveladora (para un gel)

REACTIVO	CANTIDAD
NaOH	3g
Agua destilada	200ml
Disolver	
NaBH ₄	± 10mg (una punta de espátula)
Formaldehído 37%	0.75ml

NOTA. Adicionar el formaldehído en el último momento

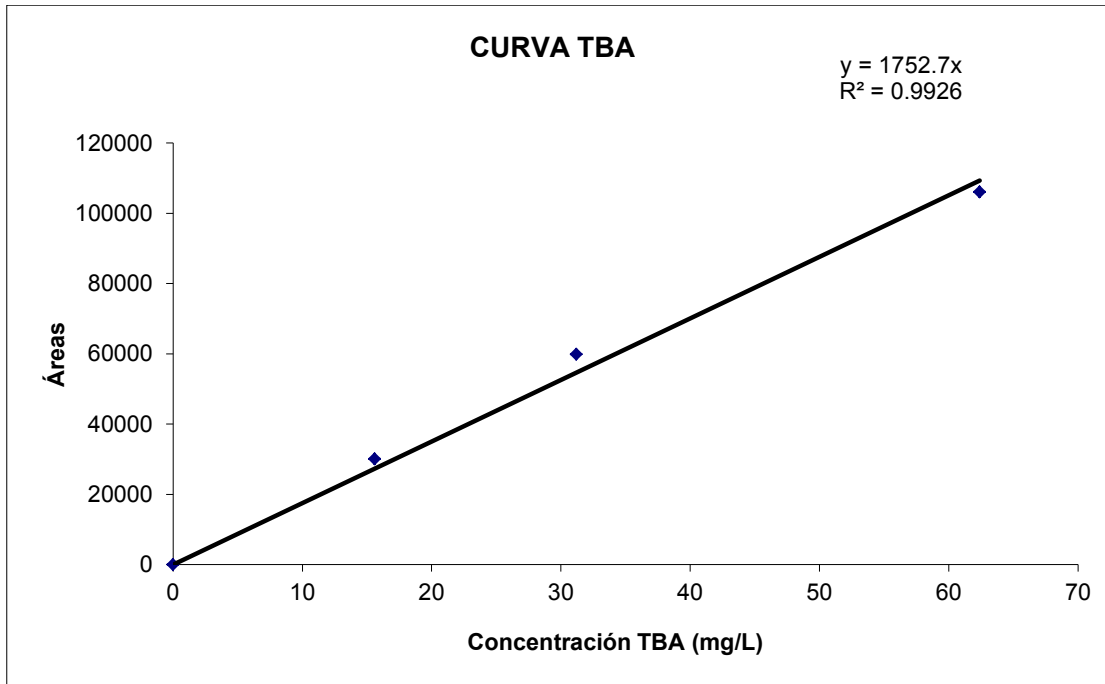
Solución preservadora

REACTIVO	CANTIDAD
Alcohol absoluto	50ml
Glicerol	20ml
Agua destilada	130ml

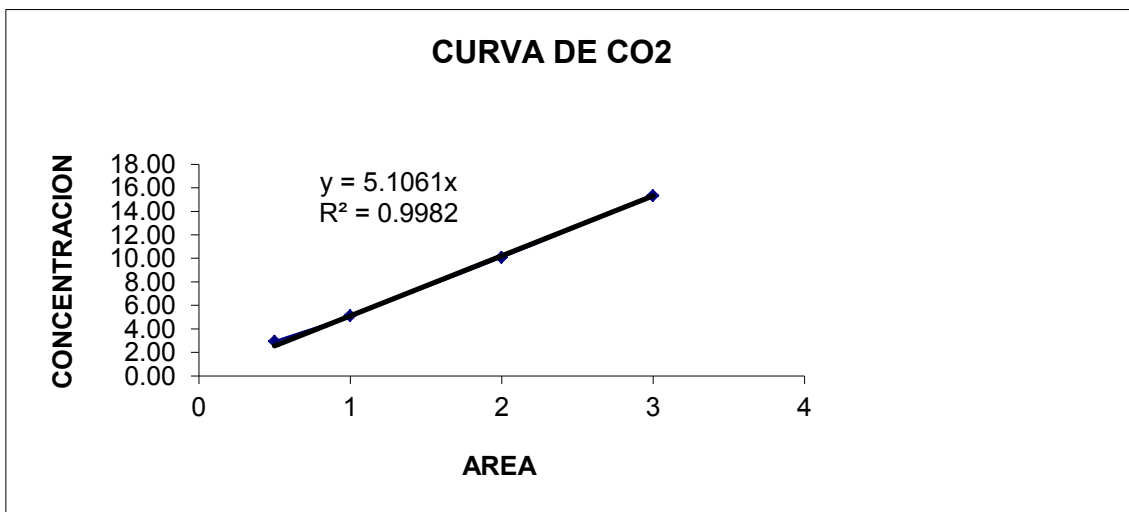
Colocar el gel en un refractario limpio adicionar 200ml de la solución fijadora incubar 3 min con agitación suave, desechar la solución para reusarla mas adelante; adicionar 200ml de solución de nitrato de plata e incubar por 10min. Transcurrido el tiempo desechar la solución en un frasco especial para desechos de plata enseguida adicionar 200ml de agua destilada y esperar 2 min desechar el agua en el frasco de desechos de plata; agregar 50ml de la solución reveladora, agitar a mano y descartar la solución, enseguida agregar los 200ml de la solución reveladora restantes hasta que se logren revelar las bandas (20 a 60min)adicionar 200ml de solución fijadora de reuso e incubar con agitación suave, desechar la solución; adicionar 200ml de agua destilada esperar 2min., tomar la fotografía del gel y recortar las bandas de interés.

APENDICE B

A2 CURVA ESTANDAR DE TBA



A3. CURVA ESTANDAR DE CO₂



APENDICE C

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 $1\mu g$ 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.

Cuantificación de proteína por el método de Coomassie

De la muestra de proteína (células), se tomó $100\ \mu L$ y se colocó en tubos Eppendorf®.

Al tubo con proteína se le adicionó solución salina (NaCl) $400\ \mu L$ al 0.85% agitando muy bien, posteriormente también se le adicionó $500\ \mu L$ (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	

8. LITERATURA CITADA

1. Acuña-Askar K, Englande Jr. AJ, Hu C, Jin G. Metil tertiary-butyl ether (MTBE) biodegradation in batch and continuous upflow fixed-biofilm reactors. In: *Proceedings of International Association on Water Quality (IAWQ)*, November 14-18. Mérida Yucatán, México, 1999.
2. Aspects of a Biofilter for the Removal of Toluene from Waste Gases *Biotechnology and bioengineering*, 1999 63(2): 175-194.
3. American Petroleum Institute (API, 1998) Ten frequently asked about MTBE in water: Washington D.C., health and Safety Department. American Petroleum Institute Soil and Groundwater Research, *Technical Bulletin No. 3*
4. Celestinos A. Influencia de la Tecnología en el Medio Ambiente. *Rev. Soc. Quím. México* 1995; 39:51-65
5. Deeb R., Alvarez-Cohen. Aerobic biotransformation of gasoline aromatics in multicomponent mixture. *Bioremediation journal*. 2000 (4):171-179.
6. EPA (1994) Chemical in the Environment: Metil-tert-Butyl Ether Office of Pollution Prevention and Toxics. U.S. Environmental Protection Agency. EPA 749-F-94-017a "http://www.epa.gov/pootintr/chemfact/s_mtbe.txt"
7. Eweis B., Watanabe N., Schroeder D. Chang D., Scow M. MTBE biodegradation in the presence of other gasoline components. In Fiorenza S., Rifai H. (2003). Review of MTBE Biodegradation and Bioremediation. *Bioremediation Journal*. 1998 7(1):1-35.

-
8. Fayolle F., Vandecasteele J.-P., Monot F. Microbial degradation and fate in the environment of methyl tert-butyl ether and related fuel oxygenates. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2001.
 9. Fortin N., Deshusses M. Treatment of Methyl tert-butyl ether vapors in biotrickling filters 1. Reactor start up, steady state performance and culture characteristics. *Environmental Science Technology*. 1999 (33):2980-2986.
 10. Francois A., Mathis H., Godefroy D., Piveteau P., Françoise Fayolle., Monot F. Biodegradation of Methyl tert-Butyl Ether and Other Fuel Oxygenates by a New Strain, *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002 (68):2754-2762
 11. Garnier P., Auria R., Augur C., Revah S. Cometabolic biodegradation of methyl t-butyl ether by *Pseudomonas aeruginosa* grown on pentane. *Applied Microbiology Biotechnology*. 1999 (51):498-503.
 12. Grady L. Biodegradation: Its measurement and microbiological basis. *Biotechnology and bioengineering*. 1990; 27:660-74
 13. Hardison L. Curry S. Cuiffetti L. Hyman M. Metabolism of diethyl ether and cometabolism of Methyl ter-Butyl Ether by a filamentous fungus, a *Graphium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997; 63:3059-3067
 14. González L. Biodegradación de éteres usados como aditivos oxigenados de la gasolina. Tesis de Licenciatura, 2005.
 15. Hyman, M., Taylor C., O'Reilly K. Cometabolic degradation of MTBE by iso-alkane utilizing bacteria from gasoline-impacted soils. *Bioremediation*. 2000 149-155.

-
16. Johnson R., Pankow J., Bender D., Price C., Zogorsky J. " To what extent will past releases contaminate community water supply wells?". *Environmental Science Technology*. 2000 (32):210-217.
 17. Kinner N.E. Fate, transport and remediation of MTBE. The University of New Hampshire. Abril, 2001. www.asce.org/pdf/kinnertestimony.pdf
 18. Lacy R. efectos del uso de gasolinas en la calidad del aire del valle de México. *Rev. Soc. Quím. Méx.* 1994 39(2):111-117.
 19. López A. Caracterización y propagación de consorcios bacterianos capaces de degradar MTBE, Tesis de Maestría, 2005.
 20. Lopes F. Mathis H., Labeé D., Monot F., Fayolle. n-alkane assimilation and tert-butyl alcohol (TBA) oxidation capacity in *Mycobacterium austroafricanum* strain. 2007
 21. Mackay D., Shiu W. Y. y Ma K. C. Illustrated Handbook of physicalchemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemical. *Volatile Organic Chemicals*. Lewis Publishers. Volume III, Boca Raton, FL. 1993 p.962.
 22. Magaña M. Degradación de MTBE y otros oxigenantes de la gasolina por hongos filamentosos. Tesis de Doctorado, 2007.
 23. Mc Gregor D., Cruzan G., Callander R., Banton M., The mutagenicity testing of tertiary-butyl alcohol, tertiary-butyl acetate and metil-butyl ether in *Salmonella typhimurium*, 2005
 24. Morales M., Deshusses M., Revah S. Microcosm and column studies on the biodegradation of MTBE in soil-water systems. In: *Proceedings of the 93th Annual Conference & Exhibition, AWMW*, June 18-22, Salt Lake City, Utah, USA.

-
25. Morrison J., Suidan M., Venosa A., Use the membranes biorreactor for biodegradation of MTBE in contaminated water. 2002
26. Munguía J. L. Eliminación de MTBE mediante un biorreactor de lecho empacado. Tesis de Maestría, 2004.
27. Piveteau P., Fayolle F., Le Penru Y., Monot F. 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*. 2001 141-148.
28. Salanitro P., Diaz A., Williams P., Wisniewski L. Isolation of a bacterial culture that degrades methyl ter-butyl ether. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994 60(7):2593-2596.
29. Salanitro .P. Understanding the limitations of microbial metabolism of ether used as fuel octane enhancers. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1995 337-340.
30. Salazar M. Eliminación de MTBE en biofiltros mediante cometabolismo con hexano. Tesis de Maestría, 2005.
31. Shields D. MTBE: Ningún riesgo para la salud, asegura PEMEX. Sección de Negocios Periódico El Financiero 2000; Enero 12 p.20
32. Squillace J., Pankow F., Korte E., Zogorski S. Review of the Environmental Behavior and Fate of Methyl tert-Butyl Ether. *Environmental Toxicology Chemical*. 1997
33. Steffan J. Mc Clay K. Vainberg S. Condee W. Zhang D. Biodegradation of gasoline oxygenates Methyl ter-butyl ether and tert-Amil ether by propanoxidizing bacteria. *Appl Environ. Microbiol.* 1997;63:4216-22

-
34. Stocking J.A., Deeb R., Flores A. Stringfellow W., Talley J., Brownell R., Kavanaugh C. Bioremediation of MTBE: a review from a practical perspective. *Biodegradation* 11:187-201, 2000.
35. Stringfellow W., Oh K., Initiation of MTBE biotreatment in fluidized-bed reactors *J. Environ. Microbiol.* 59:3110-3116, 2002
36. USEPA Environmental Protection Agency. Oxygenates in Water: Critical Information and Research Needs. Office of Research and Development. EPA/600/R-98/048. "http://www.epa.gov/ncea/pdfs/oxy_h2o.pdf" 2000.
37. USEPA Environmental Protection Agency. 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*, 2000 (65):58.
38. Vainberg S., Togna P., Steffan R. Use the membrane biorreactor for biodegradation of MTBE in contaminated water. *Journal of Environ. Engine* 2002 p.842-851
39. Wilson G., Pruden A., Suidan T., Venosa A. Biodegradation kinetics of MTBE in laboratory batch and continuous flow reactors. *Journal Environmental Engine.* 2002 128(9):824-829.
40. Zhuang W., Tay J-H., Shan Microbial adaptation to biodegradation of tert-butyl alcohol in a sequencing batch reactor. *Journal of Biotechnology*, 2005.