

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

“DEGRADACIÓN DE METIL *TERT*-BUTIL ÉTER (MTBE) Y OTROS
OXIGENANTES DE LA GASOLINA POR HONGOS FILAMENTOSOS”

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Biotecnología

P R E S E N T A

M. en B. MIGUEL MAGAÑA REYES

Director

Dr. Sergio Revah Moiseev

Enero/ 2007

“El aire es precioso para el piel roja, pues todos los seres comparten el mismo aliento: el animal, el árbol, el hombre..., todos respiramos el mismo aire. El hombre parece no notar el aire que respira. Como un moribundo que agoniza desde hace muchos días, es insensible a la pestilencia.

Pero si nosotros os vendemos nuestras tierras no debéis olvidar que el aire es precioso, que el aire comparte su espíritu con toda la vida que mantiene. El aire dio a nuestros padres su primer aliento y recibió su última expiación. Y el aire también debe dar a nuestros hijos el espíritu de la vida. Y si nosotros os vendemos nuestras tierras, debéis apreciarlas como algo excepcional y sagrado, como el lugar donde también el hombre blanco sienta que el viento tiene el dulce aroma de las flores de las praderas.

Enseñad a vuestros hijos lo que nosotros hemos enseñado a nuestros hijos: la tierra es nuestra madre. Lo que afecte a la tierra, afectará también a los hijos de la tierra. Si los hombres escupen a la tierra, se escupen a si mismos. Porque nosotros sabemos esto: la tierra no pertenece al hombre, sino el hombre a la tierra. Todo está relacionado como la sangre que une a una familia. El hombre no creó el tejido de la vida, sino que simplemente es una fibra de él. Lo que hagáis a ese tejido, os lo hacéis a vosotros mismos”

Mensaje del Gran Jefe Seattle, de la tribu Dewamish, al presidente de los Estados Unidos Franklín Pierce.

*“El Doctorado en Biotecnología de la
Universidad Autónoma Metropolitana está
incluido en el Padrón Nacional de Postgrados
del CONACYT”.*

Agradecimientos

Agradezco a mi Director de Tesis Dr. Sergio Revah Moiseev todas sus enseñanzas, su tiempo, comprensión y paciencia.

Agradezco a mis asesores: Dra. Marcia Morales Ibarría y Dra. Beatriz Cárdenas González sus valiosos comentarios para realizar este trabajo.

Agradezco a los miembros del jurado: Dr. Ernesto Favela Torres, Dra. Araceli Tomasini Campocosío, Dra. Claudia Guerrero Barajas y Dra. Beatriz Cárdenas González, por sus comentarios y tiempo dedicado a la corrección de este documento.

Agradezco a mis compañeros del Laboratorio de Emisiones Gaseosas y de la Planta Piloto de Bioprocesos.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a la Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA), al Instituto Mexicano del Petróleo (IMP) y al Institut de Recherche pour le Développement (IRD) por el apoyo económico para la realización de este trabajo.

Agradezco al Dr. José Sepúlveda Sánchez por su colaboración para obtener las fotografías con el microscopio electrónico de barrido.

Agradezco a mi familia todo su amor, apoyo y paciencia

Agradezco a mi querida Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, por lo mucho que me ha dado.

RESUMEN

RESUMEN

El amplio uso de compuestos oxigenantes (MTBE, ETBE, TAME y TBA) como aditivos de las gasolinas en varios países como México, permitió el cumplimiento de normas ambientales y tuvo efectos benéficos sobre la calidad del aire al reducir las emisiones de monóxido de carbono, hidrocarburos y óxidos de nitrógeno a la atmósfera. Sin embargo se ha asociado al MTBE en la contaminación de cuerpos de agua y aire ambiental, además de mostrar efectos negativos a la salud de animales y humanos.

En el presente trabajo, se estudió y evaluó la utilización de hongos filamentosos para la biodegradación de los compuestos oxigenantes de la gasolina: MTBE, ETBE, TAME y TBA. En la primera etapa del estudio, se colectaron varias cepas puras de hongos filamentosos así como algunos cultivos mixtos que contenían algún hongo. Se realizó una fase de adaptación en MTBE y TBA así como en otros sustratos (gasolina, tolueno, hexano y dietil éter, para evaluar la degradación potencial por cometabolismo del MTBE) en medios sólidos y líquidos para monitorear el crecimiento en estos sustratos.

Una vez que se seleccionaron los cultivos que mostraron resultados positivos de crecimiento, se evaluó la biodegradación y la respiración (O_2 , CO_2) en microcosmos con medios líquidos. Ninguna de las cepas puras de hongos filamentosos logró degradar alguno de los oxigenantes como única fuente de carbono ni por cometabolismo. Se obtuvo un cultivo mixto: consorcio *H*, compuesto por el hongo *A. terreus* y al menos una bacteria capaz de degradar MTBE (0.0026 mg/mL·h), TAME (0.0019 mg/mL·h), ETBE (0.0023 mg/mL·h) y TBA (0.0133 mg/mL·h) en cultivos líquidos, con rendimientos celulares muy bajos. La enzima responsable de la oxidación inicial del MTBE fue inducible por el propio oxigenante, y el rompimiento del enlace éter fue el paso limitante en su degradación. Los experimentos con antibióticos aportan evidencia de que la degradación fue debida principalmente al hongo *A. terreus*. El cultivo perdía la actividad degradativa si crecía en un medio rico como PDA o agar nutritivo. Un segundo cultivo mixto (consorcio *UAMI*), compuesto por un hongo filamentosos (no identificado) y al menos tres bacterias, degradaron MTBE (1.5 mg/g prot_{inicial}·h), TAME (1.8 mg/g prot_{inicial}·h) y TBA (3.4 mg/g

prot^{inicial}·h) pero no ETBE. La ruptura del enlace éter fue el paso limitante en la oxidación del MTBE por este cultivo. Los experimentos con los organismos aislados del consorcio *UAMI*, muestran que la degradación del MTBE requiere la asociación simbiótica del hongo y al menos una de las tres bacterias aisladas. Ninguno de los organismos aislados fue capaz de degradar MTBE por separado. El TBA podría representar para este cultivo, un sustrato de propagación sin que se pierda la capacidad de degradación como en el caso de los medios ricos.

Se obtuvo además un cultivo fúngico no axénico de *Fusarium solani* CBS 117476 capaz de degradar como única fuente de carbono y energía al MTBE ($V_{m_{MTBE}} = 16.4$ mg MTBE/g proteína·h, $K_{m_{MTBE}} = 0.0015$ mg/mL), TBA ($V_{m_{TBA}} = 46.3$ mg TBA/g, $K_{m_{TBA}} = 0.082$ mg/mL) y TAME (36 mg/g proteína·h) y pero no ETBE. La ruptura del enlace éter también es el paso limitante para la oxidación del MTBE por este cultivo. A la fecha solo hay un reporte de degradación de MTBE con un hongo filamentoso: *Graphium* sp., que degradó cometabólicamente al MTBE con *n*-butano a una velocidad de 1.85 mg MTBE/g proteína·h (0.35 nmol/mg proteína·min) (Hardison *et al.* 1997).

Los rendimientos para TBA (0.36 g biomasa/g TBA) y MTBE (0.18 g biomasa/g MTBE) estuvieron dentro del rango de valores reportados en la literatura.

Experimentos con MTBE marcado confirmaron que el cultivo mineraliza el 77% del carbono degradado a CO₂. El hongo *Fusarium solani* CBS 117476 degradó los intermediarios de la degradación de MTBE: HIBA y MHP. En experimentos de crecimiento en sustratos alternativos se observó que *Fusarium solani* creció bien en etanol, pero cuando se incubó en MTBE o TBA la biomasa crecida en etanol, tendió a lisarse, aunque con el tiempo recuperó la actividad de degradación de MTBE y TBA. Se requieren estudios posteriores referentes a la propagación en etanol y TBA ya que la propagación de biomasa activa es uno de los pasos limitantes para la degradación de compuestos oxigenantes. Se recomienda complementar las técnicas de análisis de cromatografía de gases con algunas otras técnicas tales como HPLC que permitan el estudio de los

metabolitos no volátiles en la fase acuosa, con el fin de establecer de modo más preciso la ruta de degradación de oxigenantes por los cultivos estudiados

En este trabajo se mostró que la degradación de los oxigenantes de la gasolina: MTBE, ETBE, TAME y TBA como única fuente de carbono y energía, por cultivos fúngicos es factible, y su utilización en sistemas de remediación tales como la biofiltración para la eliminación de este tipo de compuestos, puede ser interesante.

ABSTRACT

ABSTRACT

The extensive use of oxygenated compounds (MTBE, ETBE, TAME and TBA) as additives of gasoline in many countries like Mexico, has improved the air quality by reducing the emissions of carbon monoxide, hydrocarbons and oxides of nitrogen to the atmosphere. Nevertheless, MTBE has been associated to contamination of drinking water and environmental air, besides showing negative effects to the health of animals and humans.

In the present work, the use of filamentous fungi in the biodegradation of oxygenates of gasoline: MTBE, ETBE, TAME and TBA was evaluated. In the first stage of this study, several pure strains of fungi were collected as well as mixed cultures containing filamentous fungi. A phase of adaptation in MTBE and TBA as well as in other substrates (gasoline, toluene, hexane and diethyl ether, in order to evaluate the potential cometabolic degradation of MTBE) in solid and liquid media for monitoring the growth in these substrates was carried out.

Once the selected cultures showed positive growth, biodegradation of oxygenates and respiration (O_2 , CO_2) in microcosms in liquid media were evaluated. None of the filamentous fungi pure strains was able to degrade the oxygenates tested as a sole source of carbon and energy or by cometabolism. A mixed culture: consortium *H*, containing the fungus *A. terreus* and at least one kind of bacterium capable to degrade MTBE (0.0026 mg/mL·h), TAME (0.0019 mg/mL·h), ETBE (0.0023 mg/mL·h) and TBA (0.0133 mg/mL·h) in liquid media, with very low yields, was obtained. The enzyme responsible for the initial oxidation of MTBE was induced by the oxygenate and the breaking of the ether bond was the limit step in its degradation. The experiments with antibiotics contribute evidence that the degradation was mainly due to the fungus *A. terreus*. The culture lost its degradative activity after growing in rich media like PDA or nutritive agar. A second mixed culture (consortium *UAMI*), integrated for a filamentous fungus (not identified) and at least three bacteria, degraded MTBE (1.5 mg/g protein_{initial}·h), TAME (1.8 mg/g protein_{initial}·h) and TBA (3.4 mg/g protein_{initial}·h) but not ETBE. The rupture of the ether bond was the

limit step in the oxidation of MTBE by this culture. Experiments with isolated organisms from consortium *UAMI*, showed that the degradation of the MTBE requires the symbiotic association of the fungus and at least one of the three bacteria. None of the isolated organisms was able to degrade MTBE separately. TBA could represent, for this culture, a propagation substrate without the capacity of degradation were lost, as in the case of rich media.

A non-axenic fungal culture consisting of *Fusarium solani* CBS 117476 capable to degrade MTBE ($V_{m_{MTBE}} = 16.4$ mg MTBE/g protein·h, $K_{m_{MTBE}} = 0.0015$ mg/mL), TBA ($V_{m_{TBA}} = 46.3$ mg TBA/g protein·h, $K_{m_{TBA}} = 0,082$ mg/mL) and TAME (degradation rate = 36 mg TAME/g protein·h) as the sole source of carbon and energy but non ETBE, was obtained. The rupture of the ether bond also is the limit step for the oxidation of MTBE by this culture. There is only one reference that reports the degradation of MTBE with a filamentous fungus: *Graphium sp.*; this fungus degraded MTBE cometabolically with *n*-butane at 1.85 mg MTBE/g protein·h (0.35 nmol/mg protein·min) (Hardison *et al.* 1997).

The yields for TBA (0.36 g biomass/g TBA) and MTBE (0.18 g biomass/g MTBE) were within the range of values reported in literature.

Experiments with uniformly labeled [¹⁴C]MTBE confirmed that the culture mineralizes 77% of the degraded carbon to CO₂. The fungus *Fusarium solani* CBS 117476 degraded the degradation intermediates of MTBE: HIBA and MHP. In experiments of growth in alternative substrates was observed that *Fusarium solani* grew well in ethanol, but when it was incubated in MTBE or TBA, the biomass grown in ethanol, showed some lyses, although with the time the culture recovered the degradation activity for MTBE and TBA. Later studies of propagation in ethanol and TBA are required since the propagation of active biomass is one of the limit steps for the degradation of oxygenates. It is recommended to complement the gases chromatography analysis techniques with some other techniques such as HPLC that allow the study of the nonvolatile metabolites in the liquid phase, in order to establishing more precisely the route of degradation of oxygenates by the studied cultures.

In this work it was shown that the degradation of oxygenated compounds of gasoline: MTBE, ETBE, TAME and TBA as the sole source of carbon and energy, by fungal cultures is feasible, and their use in remediation systems such as biofiltration for eliminating this kind of compounds, could be interesting.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	7
2.1 La Gasolina	7
2.1.1 El Número de Octano	7
2.1.2 La Composición	8
2.1.3 La Presión de Vapor Reid	8
2.2 Contaminación por Gasolina	9
2.3 Reformulación de las gasolinas	10
2.3.1 La Ley de Aire Limpio	10
2.3.2 Porqué usar gasolina oxigenada	11
2.3.3 El Caso Mexicano	12
2.3.4 El uso de etanol como combustible	16
2.3.4.1 El uso de biocombustibles en México	16
2.3.4.2 Bioenergéticos en Brasil	18
2.3.4.3 Los biocarburantes en Estados Unidos	19
2.3.4.4 Los biocombustibles en otros países	20
2.4 Principales características de cada familia de sustancias oxigenantes	20
2.4.1 Alcoholes	21
2.4.2 Éteres	21
2.5 Contaminación por MTBE	26
2.6 Efectos nocivos del MTBE en animales y humanos	28
2.7 Tratamiento de MTBE y otros oxigenantes	30
3. ESTADO DEL ARTE	35
3.1 Biodegradación	35
3.1.1 Cometabolismo	36
3.1.2 Metabolismo directo	36
3.2 Biodegradación de oxigenantes de la gasolina	36
3.2.1 Factores estructurales que dificultan la biodegradación de los oxigenantes	37
3.2.2 Degradación aerobia por metabolismo directo	37
3.2.3 Degradación aerobia por cometabolismo	46
3.2.4 Degradación anaerobia	52
3.2.5 Biorremediación	55
3.2.6 Ruta de degradación	55
3.3 Uso de hongos en la biodegradación de compuestos xenobióticos	59
3.4 Recapitulación	61
4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	65
5. MATERIALES Y MÉTODOS	69
5.1 Estrategia experimental	69
5.2 Inóculos	70
5.2.1 Microorganismos	70
5.2.2 Adaptación	75
5.2.3 Mantenimiento y propagación de los consorcios <i>UAMI</i> y <i>F</i>	75
5.3 Medios de cultivo	75
5.4 Reactivos	77

5.5 Determinaciones analíticas	77
5.5.1 Técnicas cromatográficas	77
5.5.2 Cuantificación de biomasa	79
5.6 Microcosmos	80
5.6.1 Experimentos cinéticos	80
5.6.2 Determinación de las tasas de degradación	80
5.6.3 Experimentos de mineralización	81
5.6.4 Experimentos con sustratos alternativos de crecimiento	81
5.7 Observaciones al Microscopio Electrónico de Barrido (SEM)	82
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	85
6.1 Cepas puras de hongos y los consorcios <i>H</i> y <i>B</i>	85
6.1.1 Evaluación del crecimiento en atmósferas controladas	85
6.1.2 Adaptación y evaluación de la capacidad degradativa del consorcio <i>H</i> y del consorcio <i>B</i> .	86
6.1.3 Obtención de cultivos puros del consorcio <i>H</i>	91
6.1.4 Experimentos de degradación con los Consorcios adaptados <i>H</i> y <i>B</i>	95
6.1.4.1 Degradación de MTBE	95
6.1.4.2 Degradación de TBA	97
6.1.4.3 Degradación de ETBE y TAME	98
6.1.5 Conclusiones parciales con el consorcio <i>H</i>	99
6.2 El consorcio <i>UAMI</i> y el consorcio <i>F</i>	100
6.2.1 Adaptación y evaluación de la capacidad degradativa del consorcio <i>UAMI</i> y del consorcio <i>F</i>	100
6.2.2 Aislamiento de microorganismos del consorcio <i>UAMI</i>	105
6.2.3 Identificación de las bacterias del consorcio <i>UAMI</i>	106
6.2.4 Experimentos de degradación de MTBE, ETBE, TAME y TBA con el consorcio <i>UAMI</i> adaptado	108
6.2.5 Conclusiones parciales con el consorcio <i>UAMI</i>	110
6.3 El consorcio <i>S</i>	111
6.3.1 Adaptación y evaluación de la capacidad degradativa del consorcio <i>S</i>	111
6.3.2 Degradación de MTBE y TBA por el cultivo <i>S</i> como únicas fuentes de carbono y energía	112
6.3.3 Degradación simultánea de MTBE y TBA por el cultivo <i>S</i>	114
6.3.4 Determinación de las velocidades de degradación de TBA y MTBE	117
6.3.5 Experimentos de mineralización con el cultivo <i>S</i>	118
6.3.6 Degradación de otros compuestos por el cultivo <i>S</i>	118
6.3.7 Propagación del cultivo <i>S</i> con sustratos alternativos de crecimiento	120
6.3.8 Conclusiones parciales con el cultivo <i>S</i>	121
7. CONCLUSIONES	125
BIBLIOGRAFÍA	129
APÉNDICE A	145

FIGURAS

Figura 2.1 Distribución energética por combustible en el año 2000 en la ZMVM.	13
Figura 2.2 Síntesis de MTBE a partir de isobutileno y metanol.	24
Figura 2.3 Síntesis de ETBE y TAEE a partir de isobutileno o amilenos respectivamente y etanol.	25
Figura 2.4 Síntesis de TAME a partir de metanol y olefinas ramificadas.	25
Figura 3.1 Ruta metabólica propuesta para la degradación aeróbica del MTBE.	57
Figura 5.1 Estrategia experimental desarrollada para el estudio de la degradación de MTBE por cultivos fúngicos.	71
Figura 5.2 Recipientes utilizados para el enriquecimiento en medios sólidos en atmósferas controladas de los vapores de los sustratos estudiados.	73
Figura 5.3 Enriquecimiento en medio líquido del Consorcio <i>UAMI</i> en gasolina.	73
Figura 5.4 Reactores de membrana para el mantenimiento y la propagación de degradadores de MTBE.	73
Figura 6.1 Consorcio <i>H</i> en medio sólido a simple vista y al microscopio.	89
Figura 6.2 Formación de gránulos por el consorcio <i>H</i> en medio líquido.	89
Figura 6.3 <i>A. terreus</i> aislado en medio PDA y gránulos del consorcio <i>H</i> sembrados en medio mineral en atmósfera de MTBE.	89
Figura 6.4 Micrografías electrónicas de gránulos del consorcio <i>H</i> .	93
Figura 6.5 Consorcio <i>UAMI</i> en medio líquido: microorganismos aislados en medio rico.	103
Figura 6.6 Árbol Filogenético utilizado para la identificación de las bacterias aisladas del consorcio <i>UAMI</i> .	108
Figura 6.7 Gránulos del cultivo <i>S</i> en medio líquido con TBA o MTBE.	115
Figura 6.8 Cultivos del consorcio <i>S</i> en: agar nutritivo, MM2 y medio YPG.	115
Figura 6.9 Estructuras características de <i>Fusarium solani</i> CBS 117476 cultivadas en medio mineral, en agar nutritivo y en medio YPG.	115

TABLAS

Tabla 2.1 Proyección del consumo de combustibles para la ZMVM, 2005-2010.	13
Tabla 2.2 Propiedades químicas de oxigenantes selectos.	22
Tabla 2.3 Tipos de tecnologías usadas para tratar compuestos oxigenantes de combustibles.	31
Tabla 3.1 Reacciones enzimáticas propuestas/postuladas para los pasos clave en la ruta de degradación aerobia de MTBE por cultivos puros.	58
Tabla 3.2 Velocidades de degradación de oxigenantes por cultivos mixtos y puros.	60
Tabla 5.1 Medio Mineral MM1.	76
Tabla 5.2 Medio Mineral MM2.	76
Tabla 5.3 Coeficientes de partición adimensionales aire-medio de cultivo a 30 °C.	79
Tabla 6.1 Evaluación del crecimiento en medio sólido de cepas fúngicas y dos consorcios con atmósferas controladas de diferentes sustratos.	85
Tabla 6.2 Datos respirométricos de ambos consorcios degradadores de MTBE.	88
Tabla 6.3 Datos cinéticos y respirométricos de degradación de MTBE por el consorcio <i>H</i> .	96
Tabla 6.4 Datos cinéticos y respirométricos de degradación de MTBE por el consorcio <i>B</i> .	97
Tabla 6.5 Resumen de datos respirométricos y de degradación de oxigenantes de gasolina.	101
Tabla 6.6 Datos respirométricos y degradativos de oxigenantes de gasolina por el consorcio <i>UAMI</i> .	110
Tabla 6.7 Resumen de datos respirométricos y de degradación cometabólica de MTBE con hexano.	112
Tabla 6.8 Datos de degradación de los oxigenantes TAME y de los Intermediarios HIBA y MHP.	119

GRÁFICAS

Gráfica 6.1 Cinética de degradación de MTBE y respiración por el consorcio <i>B</i> en medio líquido.	87
Gráfica 6.2 Degradación de MTBE y evolución de la respiración por el consorcio <i>H</i> en medio líquido.	87
Gráfica 6.3 Degradación de MTBE por el consorcio <i>H</i> en medio líquido a pH 4.5.	92
Gráfica 6.4 Cinéticas de degradación de MTBE por el cultivo mixto <i>H</i> en medio líquido.	95
Gráfica 6.5 Últimas dos cinéticas de degradación de MTBE por el cultivo mixto <i>B</i> en medio líquido.	97
Gráfica 6.6 Degradación de TBA por el cultivo mixto <i>H</i> en medio líquido. Degradación de MTBE como referencia.	98
Gráfica 6.7 Degradación de ETBE y TAME por el cultivo <i>H</i> en medio líquido con y sin antibiótico.	99
Gráfica 6.8 Cinéticas de degradación de MTBE por los consorcios <i>UAMI</i> y <i>F</i> en medio líquido.	101
Gráfica 6.9 Cinéticas de degradación de TBA, TAME y ETBE por el consorcio <i>UAMI</i> .	102
Gráfica 6.10 Degradación de MTBE por un hongo aislado del consorcio <i>UAMI</i> en medio PDA, solo y en mezcla con las bacterias aisladas del mismo consorcio.	107
Gráfica 6.11 Degradación de MTBE por el hongo aislado del consorcio <i>UAMI</i> en medio YNB, solo y en mezcla con las bacterias aisladas del mismo consorcio.	107
Gráfica 6.12 Degradación de MTBE, ETBE, TAME y TBA por el consorcio <i>UAMI</i> .	109
Gráfica 6.13 Degradación cometabólica de MTBE con n-hexano por el cultivo <i>S</i> .	111
Gráfica 6.14 Degradación de TBA y MTBE por el cultivo fúngico <i>S</i> adaptado por tres meses en TBA.	113
Gráfica 6.15 Efecto de la presencia del TBA en la degradación del MTBE y viceversa por el cultivo <i>S</i> .	114
Gráfica 6.16 Efecto de la concentración inicial de TBA y MTBE en las velocidades de degradación específicas por el cultivo <i>S</i> .	118
Gráfica 6.17 Porcentaje de mineralización de ¹⁴ C-MTBE uniformemente marcado, como CO ₂ por el cultivo <i>S</i> .	119
Gráfica 6.18 Degradación de los oxigenantes TAME y ETBE por el cultivo <i>S</i> .	120

ACRÓNIMOS

ASTM, American Society for Testing of Materials (Sociedad Americana para la Prueba de Materiales)

BTEX, Benceno, Tolueno, Etilbenceno y m-, o- y p-Xileno

BPD, Barriles por Día

CAA, Clean Air Act (Ley de Aire Limpio)

CAAA, Clean Air Act Amendments (Enmiendas a la Ley de Aire Limpio)

CAM, Comisión Ambiental Metropolitana

CO, Monóxido de Carbono

CSTR, Continuous Stirred Tank Reactor (Reactor continuo de tanque agitado)

DEE, dietil éter

DIPE, éter di-isopropílico

DOF; Diario Oficial de la Federación

EC, Capacidad de Eliminación

ETBE, Etil *tert*-Butil Éter

EUM SDS, Estados Unidos Mexicanos Secretaría de Desarrollo Social

GAC, Granular Activated Carbon (Carbón Activado Granular)

HC, Hidrocarburos

HIBA, ácido 2-hidroxiisobutírico

IARC, International Agency for Research on Cancer (Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer)

MHP, 2-metil-2-hidroxi-1-propanol

MON, Motor Octane Number (Número de Octano Motor)

MPE, Multi-Phase Extraction (Extracción Multi-Fases)

MTBE, Metil *tert*-Butil Éter

NAAQS, National Ambient Quality Standards (Estándares Nacionales de Calidad Ambiental)

NAWQA, National Water Quality Assessment Program (Programa de Aseguramiento Nacional de la Calidad del Agua)

NO, Óxido nítrico

NO₂, Dióxido de Nitrógeno

NO_x, Óxidos de Nitrógeno

OSTP, Office of Science and Technology Policy (Oficina de Política en Ciencia y Tecnología)

PAHs, Polyaromatic Hydrocarbons (Hidrocarburos Poliaromáticos)

ppb, partes por billón (se refiere a partes por mil millones)

PRB, Permeable Reactive Barriers (Barreras Permeables Reactivas)

RVP, Reid Vapor Pressure (Presión de Vapor Reid)

RFG, Reformulated Gasolina (Gasolina Reformulada)

RON, Research Octane Number (Número de Octano Investigación)

SEMARNAT, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales

SVE, Soil Vapor Extraction (Extracción de Vapores del Suelo)

TAA, alcohol *tert*-amílico

TAEE, *tert*-amil etil éter

TAME, *tert*-Amil Metil Éter

TBA, alcohol *tert*-butílico

TBF, *tert*-butil formiato

TEL, Tetra-Ethyl Lead (Tetraetil de Plomo)

U.S. EPA, United States Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos)

USGS, United States Geological Survey (Inspección Geológica de los Estados Unidos)

USTs, Underground Storage Tanks (Tanques Subterráneos de Almacenamiento)

VOCs, Volatile Organic Chemicals (Compuestos Orgánicos Volátiles)

ZMG, Zona Metropolitana de Guadalajara.

ZMM, Zona Metropolitana de Monterrey

ZMVM, Zona Metropolitana del Valle de México.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La tecnología ha sido decisiva para el bienestar de la humanidad; no obstante, el desarrollo tecnológico en un entorno de pocas restricciones, provocó que además de la generación de satisfactores, se crearan condiciones que perjudican al ambiente. El desarrollo industrial ocasiona que un gran número de sustancias se incorporen al aire, al agua y la tierra.

Una parte de este problema se genera debido a la emisión de contaminantes provenientes del petróleo. En nuestras sociedades el petróleo y sus derivados son imprescindibles como fuente de energía y para la fabricación de múltiples productos de la industria química, farmacéutica, alimenticia, etc. (PDP 2005). La contaminación por petróleo crudo o por petróleo refinado (combustóleo, gasolina, y otros productos obtenidos por destilación fraccionada y procesamiento químico del petróleo crudo) es generada desde diferentes fuentes (CP 2005, EUM-SDS 1994): desperdicios domésticos, fugas y derrames de oleoductos y tanques de almacenamiento de hidrocarburos, emisiones evaporativas de gasolineras, refinerías y automóviles y en particular debido a los procesos de combustión, los cuales son la causa principal de la contaminación del aire causada por el hombre (Al Farayedhi 2002, GSP 2005). A finales de los 50s, la refinación del petróleo parecía haber alcanzado un nivel satisfactorio representando un buen balance entre la energía y la economía. Sin embargo, el gran incremento en la demanda de energía y el deterioro del ambiente llevó al reconocimiento durante los 60s que la producción de energía y el transporte automotriz fueron las causas principales del deterioro de la calidad del aire. Por los 70s fue claro que la refinación del petróleo tenía que encontrar un equilibrio: energía, economía y ambiente juntos (Ancillotti & Fattore 1998).

Con el objeto de reducir y regular la emisión de algunos compuestos contaminantes provenientes de la combustión de combustibles fósiles, se crearon leyes y restricciones que incluyeron un cambio en la composición de la gasolina, uno de los productos del petróleo más usado en nuestros días. Para tal efecto, a través de un programa de reformulación de combustibles, se adicionaron compuestos oxigenantes como el metil *tert*-butil éter (MTBE), lo que permitió el cumplimiento de las normas establecidas, mejorando la combustión de la gasolina (Erdal & Goldstein 2000, EUM-SDS 1994).

El MTBE comenzó a utilizarse en las gasolinas a finales de los 70s en Estados Unidos como sustituto del tetraetilo de plomo, el cual causaba graves problemas de salud pública (Nadim *et al.* 2001). El uso del MTBE tuvo efectos benéficos sobre la calidad del aire pues redujo las emisiones de monóxido de carbono, hidrocarburos y óxidos de nitrógeno a la atmósfera pero se convirtió en un problema cuando se le asoció con algunos malestares en la salud (Nadim *et al.* 2001). La problemática se acentuó cuando se dio a conocer que el MTBE había contaminado una gran cantidad de pozos de agua para consumo humano en Estados Unidos. La preocupación por el MTBE aumentó cuando, de acuerdo con algunos estudios realizados en animales, se determinó que dicha sustancia era capaz de generar cáncer. Este compuesto está clasificado por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (U.S. EPA) como probable cancerígeno a altas dosis (U.S. EPA 1997). Aunque la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (International Agency for

Research on Cancer: IARC), lo clasifica en el grupo 3 “*El agente no es clasificable como cancerígeno en cuanto a su efecto en humanos*” (IARC 1999a, b).

En México existen pocos estudios sobre la contaminación por gasolina y en específico por MTBE, uno de ellos fue realizado por el gobierno del Distrito Federal en el año 2001 donde se analizaron muestras de suelo y agua en los alrededores de las gasolineras. Los resultados mostraron que había contaminación por MTBE, de 225 muestreos que se hicieron en 75% de ellos se detectó su presencia en niveles superiores a los límites establecidos en Estados Unidos por la EPA (CAG 2005).

Existe una gran variedad de procedimientos para eliminar contaminantes del ambiente, sin embargo, debido a sus propiedades, se considera que el MTBE es difícil de remover completamente por tratamientos fisicoquímicos y biológicos. Los tratamientos biológicos sin embargo, han mostrado ser ambientalmente nobles y prometedores (U.S. EPA 1998b, 2004). La remoción de MTBE con microorganismos es viable por lo cual se requiere de investigaciones referentes a la selección de cepas degradadoras, condiciones adecuadas de cultivo, etc.

Este trabajo propone estudiar el potencial de los hongos filamentosos para biodegradar compuestos oxigenantes de la gasolina entre los cuales se encuentran el MTBE, el etil *tert*-butil éter (ETBE), el *tert*-amil metil éter (TAME) y el alcohol *tert*-butílico (TBA). La identificación de especies fúngicas capaces de degradar oxigenantes y la comprensión de las condiciones en las cuales la degradación se lleva a cabo, harían posible su utilización en sistemas de tratamiento de corrientes de aire y agua contaminadas con estos compuestos.

En el Capítulo II “*Antecedentes*”, se plantea la problemática generada por el uso de las gasolinas y las medidas tomadas para combatir estos problemas; los motivos por los que se usan los compuestos oxigenantes como aditivos de las gasolinas modernas; las características fisicoquímicas de las sustancias oxigenantes y los problemas ambientales y de salud derivados del uso de estos compuestos, así como algunas alternativas para el tratamiento de MTBE y otros oxigenantes. En el Capítulo III “*Estado del arte*”, se presenta una revisión acerca de las investigaciones sobre la biodegradación del MTBE y de otros oxigenantes de la gasolina, así como las rutas de biodegradación planteadas para el MTBE. También se examina el uso de los hongos en la biodegradación de compuestos xenobióticos. En el Capítulo IV “*Justificación y objetivos*”, se exponen algunas de las características de los hongos que les confieren el potencial para la degradación de los oxigenantes de las gasolinas, así como los objetivos de la presente Tesis. El Capítulo V “*Materiales y métodos*” explica la estrategia experimental, el origen y manipulación de los grupos microbianos empleados, las determinaciones analíticas y los tipos de experimentos realizados. El Capítulo VI “*Resultados y discusión*” expone los resultados experimentales alcanzados con diferentes consorcios y cultivos puros referentes a la adaptación de los cultivos, degradación de los oxigenantes de la gasolina MTBE, ETBE, TAME y TBA, mineralización de MTBE, degradación de algunos de los intermediarios planteados para la degradación bacteriana del MTBE y la propagación en sustratos alternativos de crecimiento. El Capítulo VII reseña las conclusiones derivadas de este trabajo y las perspectivas para trabajos futuros.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2. ANTECEDENTES

2.1 La Gasolina

La gasolina es una mezcla muy volátil y fácilmente inflamable de hidrocarburos y algunos compuestos aditivos. Se obtiene mediante la destilación fraccionada del petróleo y de procesos catalíticos, y se usa para impulsar los motores de los automóviles. Los procesos de destilación y catalíticos producen las tres corrientes principales: primaria, catalítica y reformada que forman la mezcla -pool en inglés- de hidrocarburos que en la actualidad constituyen la gasolina (Garfias & Díaz 2003). Los principales constituyentes de la gasolina típica son las parafinas (50-80% v/v), olefinas (0-15% v/v) y aromáticos (15-40% v/v), principalmente bencenos y naftalenos con muy pocos hidrocarburos poliaromáticos (PAHs) (Adam *et al.* 2002).

A continuación se describen algunas de las propiedades de la gasolina que tienen gran relevancia en el desempeño del motor y en la formación de emisiones contaminantes.

2.1.1 El Número de Octano

Los motores de combustión interna están diseñados para aprovechar eficientemente el combustible, pero las *n*-parafinas en un combustible de baja calidad, se queman en ellos antes o después de su punto óptimo de ignición, causando un ruido de martilleo metálico denominado “golpeteo” cuando el vehículo acelera bruscamente (Molina 1993). El uso de una gasolina de menor calidad que la requerida por el motor causa calentamiento, pérdida de potencia, incrementa el consumo de gasolina e intensifica la emisión de hidrocarburos parcialmente quemados (Garfias & Díaz 2003). En 1916, Thomas Midgley, relacionó el golpeteo de la máquina con la baja calidad de combustión del combustible “más tarde conocida como octano” (Nadim *et al.* 2001). En los 30s los laboratorios industriales y gubernamentales estadounidenses acordaron el procedimiento para determinar el golpeteo en una máquina de diseño especial. La unidad de intensidad de golpeteo de un combustible se denomina número de octano y se define como el porcentaje en volumen de 2,3,4 trimetil pentano (isooctano) que debe mezclarse con *n*-heptano para igualar la intensidad de golpeteo del combustible que se prueba (Garfias & Díaz 2003). Se asigna al *n*-heptano, que golpea muy fuerte, un índice de octano de cero y al isooctano un índice de octano de 100 (Molina 1993). El número de octano de un combustible es una medida de su calidad y desempeño antidetonante y es sin duda la propiedad principal de una gasolina (Al Farayedhi 2002). El golpeteo depende de las revoluciones de la máquina, esto es, la velocidad con la cual se desplaza el pistón, por lo que se suelen determinar experimentalmente dos números de octano a diferente velocidad: el número de octano de investigación (research octane number: RON) y el número de octano motor (motor octane number: MON). El primero corresponde a una velocidad de 600 rpm y simula condiciones de recorrido citadino. El segundo se refiere a una velocidad de giro del motor de 900 rpm y simula el tráfico en carretera. Se hace referencia a un tercer número de octano que se conoce como Camino (Road) y que es igual a $(R+M)/2$ (Garfias & Díaz 2003). La Unión Europea referencia el combustible de acuerdo al valor de octano de investigación con los grados comunes de Regular y Premium de 91 y 98 octanos, respectivamente. Los EUA, por

otra parte, usan el octano Camino para definir el índice de octano. Esto resulta en un índice de octano aparentemente más bajo en los EUA por comparación con los grados en la Unión Europea (Woodward 2001).

En EUA y otros países se reconocen tres tipos de gasolinas que se clasifican de acuerdo a su índice de octano (López 2002):

Gasolina Regular (unleaded): Con un índice de octano mínimo de 87.

Gasolina MidGrade cuyo índice de octano mínimo es de 89.

Gasolina Premium con un índice de octano mínimo de 92.

2.1.2 La Composición

Para incrementar el octano de la gasolina se altera su composición: se enriquece con hidrocarburos ramificados y aromáticos y se empobrece de hidrocarburos lineales. Existen diversos procesos que permiten incrementar el octano de la gasolina: reformación, isomerización y alquilación (Garfias & Díaz 2003). Otra forma de incrementar el número de octano es mediante la adición de aditivos antidetonantes. En 1921, Midgley descubrió la propiedades antidetonantes del tetraetilo de plomo (tetraethyl lead, TEL) (Nadim *et al.* 2001). Comercialmente introducidas en los EUA en los 20s, las gasolinas con plomo pronto se volvieron estándar (Thomas 1995). Debido a sus características tóxicas y a su efecto dañino en los materiales activos de los dispositivos catalíticos usados para controlar las emisiones, los aditivos de plomo actualmente no se usan en EUA, en México y en otros países. Una práctica más reciente para mejorar el octano de los combustibles es usar ciertos compuestos orgánicos que contienen oxígeno llamados oxigenantes. Los oxigenantes más comúnmente usados son el metil *tert*-butil éter (MTBE), metanol y etanol (Al Farayedhi 2002). Las sustancias oxigenantes tienen la peculiaridad de tener un elevado número de octano, (el MTBE tiene un número de octano Camino de 110) por lo que constituyen una valiosa herramienta para satisfacer la creciente demanda de gasolina de mayor octano y limitar el contenido del benceno que es un cancerígeno (Garfias & Díaz 2003).

2.1.3 La Presión de Vapor Reid

La presión de vapor es la propiedad que más influye en las pérdidas evaporativas y para determinarla se sigue la técnica empírica Reid, (Reid Vapor Pressure, RVP) que es un procedimiento experimental que consiste en medir la presión que ejerce el vapor producido por una muestra de gasolina líquida que se calienta de 0 °C (32 °F) a 37.8 °C (100 °F) en el interior de un contenedor cerrado compuesto por dos cámaras, una que contiene el líquido y otra el vapor. La presión de vapor es una propiedad ambiental importante que puede ser afectada por los oxigenantes. Una presión de vapor muy alta propicia la evaporación de la gasolina, lo cual además de constituir en sí un desperdicio, afectarían desfavorablemente la atmósfera. Sin embargo, una gasolina de muy baja presión de vapor haría muy difícil el encendido del motor. Por su baja volatilidad, algunos éteres como el etil *tert*-butil éter (ETBE) y el *tert*-amil metil éter (TAME), son particularmente útiles para reducir la presión de vapor de la gasolina. La presión de vapor Reid máxima vigente para la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) es de 7.8 libras por pulgada cuadrada (Garfias & Díaz 2003).

2.2 Contaminación por Gasolina

En años recientes, los motores de gasolina (máquinas de ignición de chispa), han causado una gran preocupación debido a sus emisiones contaminantes. En adición a la contaminación causada por las emisiones vehiculares, otras fuentes significativas de contaminación por gasolina, son las fugas y los derrames en sistemas de tanques subterráneos y superficiales de almacenamiento y en sistemas de tuberías (Nadim *et al.* 2001). Se acostumbra distinguir las emisiones vehiculares, según su origen, en evaporativas que son las que resultan de la volatilización directa de la gasolina, y de escape que son consecuencia de la combustión. Los principales contaminantes de escape de las máquinas de combustión interna son: el bióxido de carbono (CO_2), responsable en buena parte del llamado efecto de invernadero; tres sustancias tóxicas: los óxidos de nitrógeno (NO_x), monóxido de carbono (CO) e hidrocarburos parcialmente quemados (HC), y otras cuatro que además de ser tóxicas tienen carácter cancerígeno potencial: benceno, formaldehído e hidrocarburos policíclicos aromáticos. Las emisiones automotrices contribuyen a los cambios globales atmosféricos y posiblemente son peligrosos a todas las formas de vida y alteran el clima de la tierra (Al Farayedhi 2002, Garfias & Díaz 2003).

La formación de óxidos de nitrógeno (NO_x) durante el proceso de combustión es el resultado de las temperaturas extremadamente altas existentes dentro de la flama de combustión. En las máquinas de ignición de chispa, la mayor parte es el óxido nítrico (NO) además de un pequeño porcentaje de dióxido de nitrógeno (NO_2). Ya que aparecen juntos, los óxidos de nitrógeno son referidos como NO_x . La temperatura de la flama dentro de la cámara de combustión es directamente afectada por el número de octano del combustible, el cual afecta la producción de NO_x . Los óxidos de nitrógeno juegan un papel principal en la formación de lluvia ácida a través de la reacción del dióxido de nitrógeno con el vapor de agua atmosférica que produce el ácido nítrico (Al Farayedhi 2002).

El monóxido de carbono (CO) es un producto de la oxidación incompleta del combustible. La formación de CO es altamente dependiente de la disponibilidad de oxígeno al momento de la combustión. El CO es un gas tóxico, incoloro e inodoro que, cuando entra al torrente sanguíneo, impide el transporte de oxígeno desde los pulmones al resto del cuerpo (Al Farayedhi 2002).

Las máquinas de combustión interna, emiten gases que contienen una mezcla de hidrocarburos, algunos de los cuales son más reactivos que otros. Cuando los HC se exponen a la luz solar, ocasionan una serie de reacciones fotoquímicas que llevan a la formación de ozono. El ozono es uno de los principales componentes del smog. Los productos típicos de la combustión por ignición de chispa son parafinas, 33%; olefinas, 27%; acetileno, 8% y aromáticos, 32%. Generalmente se observa que cuando el número de octano de un combustible se incrementa, las emisiones de CO y HC decrecen pero las emisiones de NO_x se incrementan. Más aún, conforme la velocidad de la máquina aumenta, las emisiones de CO y NO_x se incrementan pero decrecen las emisiones de HC (Al Farayedhi 2002).

2.3 Reformulación de las gasolinas

2.3.1 La Ley de Aire Limpio

Por casi un siglo, la composición de la gasolina permaneció esencialmente sin cambios. Desde principios del siglo pasado hasta la introducción de gasolinas sin plomo a principios de los 80s, la composición de la gasolina fue básicamente una mezcla de hidrocarburos más un aditivo de plomo para incrementar el índice de octano, realizándose ajustes estacionales de la presión de vapor. Sin embargo, a partir de los 70s, los productores de gasolina en los EUA, en cooperación con agencias federales y estatales, han desarrollado gasolinas reformuladas que intentan reducir la contaminación sin detrimento del desempeño de las máquinas, buena manejabilidad y aceptación del público (Stern & Kneiss 1997). Desde 1970, la U.S. EPA, ha tenido la responsabilidad de establecer y asegurar los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental (National Ambient Quality Standards, NAAQS). En ese mismo año, en los EUA se promulgó la Ley de Aire Limpio (Clean Air Act, CAA). Esta Ley ordenó la prohibición progresiva de gasolina con plomo a finales de 1973. La transición de gasolina con plomo a gasolina sin plomo fue lenta y tomó muchos años en completarse. La prohibición primaria de gasolina con plomo se completó en 1986. En julio de 1974 se introdujeron los convertidores catalíticos en los automóviles para la oxidación de CO y HC en las emisiones automotrices. La completa remoción de aditivos de plomo de la gasolina fue necesaria para la operatividad técnica de los convertidores catalíticos ya que el plomo causa que los catalizadores se desactiven rápidamente. Una consecuencia técnica importante de la reducción de la concentración de plomo en la gasolina fue una notable caída en el número de octano de la gasolina, el cual afectó a millones de automóviles diseñados para combustibles de alto número de octano. La solución inmediata para el problema fue elevar el número de octano al incrementar las concentraciones de butanos y aromáticos en la gasolina. Una segunda y más innovadora solución fue el uso de una nueva clase de compuestos oxigenados de alto octano. Los compuestos oxigenados, una vez que se agregan a la gasolina, se denominan oxigenantes (Ancillotti & Fattore 1998, Nadim *et al.* 2001).

De acuerdo a la Sociedad Americana para la Prueba de Materiales (American Society for Testing of Materials, ASTM) ASTM D 4814: “un oxigenante es definido como un compuesto orgánico sin cenizas, que contiene oxígeno, tal como un alcohol o éter, el cual puede ser usado como un combustible o suplemento combustible”. A partir de 1973, los oxigenantes comenzaron a ser adicionados a la gasolina y a jugar un papel importante en la formulación de la gasolina, como elevadores de octano, en reemplazo de los alquilos de plomo. Durante la crisis del petróleo a principios de los 70s, los oxigenantes originados de fuentes parcialmente alternativas al petróleo crudo, proporcionaron una ventaja adicional ya que incrementaron el volumen de la gasolina (Ancillotti & Fattore 1998).

Muchos países han reducido o eliminado el uso de aditivos de plomo en motores de gasolina (Thomas 1995). Este hecho intensificó el interés en los aditivos oxigenantes. Alcoholes ligeros tales como el metanol y etanol, ya existían en el mercado como intermediarios químicos. También se demostró que algunos alquil éteres ramificados, como MTBE, ETBE, y algunos alquil fenil éteres tales como el anisol y fenetol tienen características de octano muy interesantes. Entre los oxigenantes disponibles en el mercado,

el MTBE es el que más se usa debido a su baja presión de vapor, compatibilidad con los sistemas de mezclado y distribución para la gasolina, su alto índice de octano, disponibilidad, facilidad de producción y bajo costo. Las primeras plantas en producir cantidades industriales de MTBE fueron puestas en marcha por ANIC en Italia en 1973 y por Chemische Werke Heuls en Alemania en 1976 (Ancillotti & Fattore 1998, Stocking *et al.* 2000).

En 1975, la producción entera de autos nuevos en EUA tenía convertidores catalíticos y funcionaban con gasolina sin plomo. Sin embargo, la solución “gasolina sin plomo/convertidores catalíticos” no resolvía completamente la disminución de las emisiones de los autos. A finales de los 80s, la preocupación pública en EUA acerca de la alta concentración invernal de CO y los altos niveles de ozono en el verano, llevaron a considerar un cambio profundo en la composición (reformulación) de la gasolina, como un medio esencial para disminuir la polución. El término gasolina reformulada se generó, desarrolló y promovió por la industria petrolera y se refiere a las gasolinas con características similares a las convencionales, pero en las que las corrientes o componentes que contribuyen en mayor proporción a la generación de contaminantes al aire se someten a procesos adicionales o son refinados con la finalidad de prevenir su rápida evaporación, mejorar el proceso de combustión y reducir su presencia en las emisiones (Ancillotti & Fattore 1998, Garfías & Díaz 2003).

2.3.2 Porqué usar gasolina oxigenada

Desde 1979, los oxigenantes se han usado para mejorar el octano y para reemplazar al plomo a niveles entre 2% y 8% en volumen en áreas limitadas de los EUA. En 1981, la U.S. EPA aprobó su uso en la gasolina hasta 10% en volumen. Durante los 80s, se incrementó el uso de oxigenantes ya que algunos estados implantaron programas de gasolinas oxigenadas para controlar la polución del aire con CO en climas fríos. El uso de altos porcentajes de oxigenantes en gasolina se extendió a nivel nacional en 1990 debido a las Enmiendas a la Ley de Aire Limpio (Clean Air Act Amendments, CAAA), las cuales ordenaron el uso de oxigenantes a través de dos programas: el programa estacional de oxicomcombustibles (Oxyfuel), que requirió el 2.7% de oxígeno en peso en la gasolina (equivalente a 15% de MTBE en volumen), y el programa Federal de Gasolina Reformulada (RFG), aplicado durante todo el año, que exigía el 2% de oxígeno en peso (equivalente a 11% en volumen de MTBE) en áreas donde las concentraciones de CO en el otoño e invierno, o los niveles de ozono en el verano respectivamente, excedieran sus NAAQS. (Erdal & Goldstein 2000, Stocking *et al.* 2000).

Las CAAA dieron a los oxigenantes el nuevo papel de “aditivos de aire limpio”, más que “proveedores de octano”. Ambos tipos de combustibles (reformulados y oxigenados) desplazan a muchos de los hidrocarburos tóxicos de la gasolina y la queman más limpiamente debido al mejoramiento de su combustión. El resultado neto es una reducción en el aire ambiental de la contaminación causada por vehículos, y un mejoramiento de la calidad del aire (Ancillotti & Fattore 1998, Stern & Kneiss 1997).

Las CAAA tuvieron dos objetivos para el desempeño de las RFG (Al Farayedhi 2002): 1) una reducción del 15% de las emisiones de Compuestos Orgánicos Volátiles (VOCs)

formadores de ozono, y 2) una reducción del 15% en el aire de tóxicos tales como el benceno.

Basados en los datos de calidad de combustibles colectados en 1995 y 1996, el programa de RFG excedió todas las reducciones anticipadas de la polución a un costo proyectado menor. Las emisiones de tóxicos al aire se redujeron en más de 22%, las emisiones de VOCs en un 28%, las emisiones de NO_x en aproximadamente 2-3%, y las emisiones de benceno de la gasolina en 37%. Los oxigenantes probaron ser un modo efectivo de reducir los niveles de los aromáticos peligrosos en la gasolina, manteniendo los niveles de octano, extendiendo el rendimiento de un barril de petróleo (se requiere refinar un 1.0-1.5% menos crudo para producir la gasolina base para las gasolinas oxigenadas). De acuerdo a la EPA de California, el uso de RFG reduce el uso de benceno (un conocido cancerígeno) por lo tanto también disminuye los riesgos de cáncer asociados con la exposición a dicho compuesto (Nadim *et al.* 2001).

A pesar del mejoramiento significativo en las concentraciones pico de ozono, en los 90s, algunas preocupaciones debidas a problemas anecdóticos de salud atribuidos al MTBE, un incremento temporal anormal en el precio de RFG y especulaciones acerca del impacto de los oxigenantes en la economía de los combustibles y el desempeño de las máquinas cuestionó el éxito final de RFG y abrió un debate sobre la verdadera efectividad del programa de RFG. No obstante el futuro controversial de los oxigenantes como “aditivos de aire limpio”, se espera que su uso se mantenga y su papel de “proveedores de octano” se extienda, que además reemplacen a los butanos y aromáticos en USA y completen la prohibición del plomo en algunas áreas del sudeste de Europa y en otras áreas de rápida expansión económica como China (Ancillotti & Fattore 1998).

El MTBE y el etanol son los oxigenantes de mayor uso en los EUA. A principios de los 70s, la producción de MTBE fue de alrededor de 12,000 barriles por día (BPD), y fue el 39° químico más producido en los EUA. Para 1998, se convirtió en el cuarto y la demanda de oxigenantes para la producción de gasolinas reformuladas y oxigenadas fue de 252,000 BPD de MTBE, 41,000 de etanol y 17,000 de otros éteres. El consumo mundial de MTBE en 1992 se estimó en 224,000 BPD y alcanzó 487,000 BPD en 1998. Otros oxigenantes de combustibles que están en uso o pueden ser potencialmente usados para cumplir con los requerimientos de combustibles oxigenados de las CAAA de 1990 incluyen ETBE, TAME, éter di-isopropílico (DIPE), alcohol *tert*-butílico (TBA) y metanol (Braids 2001, Erdal & Goldstein 2000, Garfias & Díaz 2003).

2.3.3 El Caso Mexicano

Actualmente los principales combustibles empleados en la ZMVM son las gasolinas con el 35%, el gas natural con el 35%, el gas LP con un 18% y el diesel vehicular con el 9%. La Figura 2.1 muestra la distribución energética por tipo de combustible (EUM-CAM 2002).

Desde 1990 el transporte es el principal consumidor de energía, su demanda más baja en el periodo 1990-2000 fue del 45% y la mayor fue de 50.7% del total de la energía generada por la combustión de los combustibles incluidos en este balance energético.

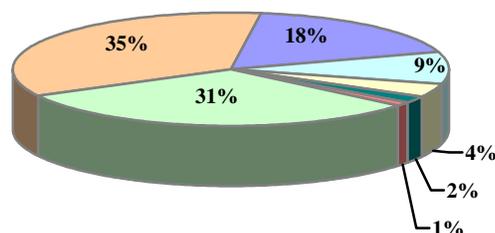


Figura 2.1 Distribución energética por combustible en el año 2000 en la ZMVM. ■ Gas natural, ■ Gasolina Magna, ■ Gas LP, ■ PEMEX Diesel, ■ Gasolina Premium, ■ Diesel Industrial, ■ Combustible Industrial.

Fuente: EUM-CAM 2002.

En el periodo 1990-2000 la demanda de gasolina se incrementó en casi un 19%; aunque el consumo de gasolina *Nova* fue disminuyendo hasta desaparecer; en la misma proporción la demanda de gasolina *Magna* fue aumentando y en 1996 se inicia la distribución de la nueva gasolina PEMEX *Premium*. Debido al aumento previsto en la población, el dinamismo de la economía y las tendencias históricas del consumo de combustibles de la ZMVM, se puede suponer que se espera un crecimiento importante para el año 2010 en la demanda energética (Tabla 2.1) a una tasa anual de 4.2% para la gasolina y de 4.8% para el diesel (EUM-CAM 2002).

Tabla 2.1 Proyección del consumo de combustibles para la ZMVM, 2005-2010.

Año	miles de barriles/año					
	PEMEX Premium	PEMEX Magna	Diesel industrial *	PEMEX diesel	Gas LP	Gas natural **
2005	6,675	44,669	2,674	12,918	35,258	257,893
2006	6,955	46,545	2,803	13,538	36,492	273,624
2007	7,247	48,500	2,937	14,187	37,769	290,315
2008	7,551	50,537	3,078	14,868	39,091	308,024
2009	7,869	52,659	3,226	15,582	40,459	326,814
2010	9,460	53,609	3,381	16,330	41,875	346,750

* Bajo en azufre

** Millones de pies cúbicos

Fuente: EUM-CAM 2002.

El sector transporte aporta 21% del total de las emisiones de CO₂ producidas en el país. En la ZMVM, este sector contribuyó con 40% de las emisiones de gases de efecto invernadero en 1998, seguido por la industria con 37%, y el sector residencial y comercial con el restante 23%. La suma de las emisiones de CO₂ generadas por el sector en las Zonas Metropolitanas de Guadalajara (ZMG), Monterrey (ZMM) y la ZMVM representa aproximadamente 34% de las emisiones nacionales del mismo sector. Lo anterior orienta sobre la importancia de mitigar las emisiones de los gases de efecto invernadero en las

zonas urbanas, y al mismo tiempo de generar estrategias para controlar los problemas de la contaminación local. A continuación se enlistan diferentes medidas que se tomaron para controlar los contaminantes locales provenientes del sector transporte en la ZMVM. Estas medidas requirieron la participación de la industria petrolera nacional, la industria automotriz y las autoridades ambientales de la ZMVM (Cuatecontzi *et al.* 2006).

a) 1989. Se inició el Programa Hoy No Circula, el Programa Semestral de Verificación Vehicular y comenzó la distribución de gasolina oxigenada en un 5% con MTBE (Cuatecontzi *et al.* 2006). En México, el MTBE se usa desde el invierno de 1989-1990, cuando se introdujo una gasolina reformulada denominada *Magna Sin* para reducir las emisiones de plomo al ambiente y disminuir las emisiones de monóxido de carbono e hidrocarburos y en consecuencia los niveles de ozono, reemplazando la gasolina con plomo *Nova*. Aunque que se contaba con cierta información en la bibliografía técnica mundial sobre la bondad de la gasolina oxigenada, fue necesario hacer pruebas en México debido a cuatro factores: la altura de la ciudad sobre el nivel del mar, las características de la gasolina mexicana, la naturaleza del parque vehicular y una atmósfera muy contaminada, pero sobre todo por el temor de que podrían incrementarse las emisiones de óxidos de nitrógeno. Dichos estudios sustentaron la incorporación inicial de MTBE a una concentración de 5% en volumen, en la gasolina empleada en la ZMVM, la ZMG y la ZMM, las zonas urbanas más grandes de México. Actualmente, hay dos formulaciones de gasolina en el país, *Magna*, con un número de octano Camino de 87 y *Premium*, con un octano de 93, ambas sin plomo (Garfías & Díaz 2003, Manzanares *et al.* 2001).

b) 1991. Introducción de vehículos con convertidores catalíticos de 2 vías (Cuatecontzi *et al.* 2006). En 1988, se acordó que los nuevos modelos, 1991 y posteriores, saldrían con el convertidor catalítico incorporado de fábrica y motores más eficientes. Para garantizar su buen funcionamiento era necesario contar con gasolina sin plomo con ciertas especificaciones, se decidió utilizar gasolina de un octano Camino 87, que corresponde aproximadamente a un número de octano de Investigación de 92 (Garfías & Díaz 2003).

c) 1992. Se redujo el contenido de hidrocarburos reactivos en las gasolinas *Nova* y *Magna-Sin* (Cuatecontzi *et al.* 2006).

d) 1993. El diesel desulfurado (0.5% de azufre) fue sustituido por el Diesel *Sin* (0.05% de azufre). Se inició la introducción de los convertidores catalíticos de tres vías para controlar las emisiones de NO_x, HC y CO (Cuatecontzi *et al.* 2006).

e) 1995. Reducción a 0.01 g/gal del contenido de plomo en la gasolina *Nova*. PEMEX-Refinación incorporó el sistema de recuperación de vapores en cuatro terminales de almacenamiento y distribución de gasolinas (Cuatecontzi *et al.* 2006).

f) 1997-1998. La gasolina con plomo *Nova*, fue completamente prohibida y se inició la venta de gasolina *Magna* reformulada con un contenido menor de aromáticos y olefinas (Cuatecontzi *et al.* 2006).

Las medidas a y b tuvieron un impacto en la mitigación de los gases de efecto invernadero. El uso de convertidores redujo considerablemente las emisiones de monóxido de carbono e

hidrocarburos e incluso de metano, pero aumentó las emisiones de los óxidos de nitrógeno y del bióxido de carbono. En los primeros meses de la aplicación del programa Hoy no Circula se redujo el consumo de combustibles; posteriormente el efecto fue negativo al motivar la adquisición de un segundo vehículo por familia. Este programa actualmente ayuda para motivar la modernización del parque vehicular (Cuatecontzi *et al.* 2006).

Con el propósito de reducir las emisiones contaminantes y mejorar la calidad del aire, en la última década se instrumentó, el Programa Integral para el Control de la Contaminación Atmosférica 1990-1994 (PICCA). Posteriormente, en 1996, los Gobiernos Federal, del Estado de México y del Distrito Federal acordaron la instrumentación del Programa para Mejorar la Calidad del Aire en el Valle de México 1995-2000, conocido como PROAIRE, con el propósito de ampliar, reforzar y dar continuidad a las medidas iniciadas a principios de la década. El objetivo del PROAIRE estuvo enfocado explícitamente a la reducción de las concentraciones pico y promedio de ozono, con la finalidad de disminuir el riesgo a la salud asociado con la exposición de corto y largo plazo a este contaminante. Las líneas estratégicas del PROAIRE fueron: a) reducción de emisiones en la industria (industria limpia), b) disminución de emisiones por kilómetro en vehículos automotores (vehículos limpios), c) reducción de las tasas de crecimiento de los kilometrajes recorridos en vehículos automotores (nuevo orden urbano y transporte limpio), y d) reducción de la erosión del suelo (recuperación ecológica) (EUM-CAM 2002).

Con base en los resultados y experiencias obtenidas en los dos programas anteriores, en febrero de 2002, los miembros que integran la Comisión Ambiental Metropolitana (CAM) presentaron el tercer Programa para Mejorar la Calidad del Aire de la Zona Metropolitana del Valle de México 2002-2010 (PROAIRE 2002-2010), el cual reúne 89 acciones a desarrollarse en el corto, mediano y largo plazo por los Gobiernos Federal, del Estado de México y del Distrito Federal, así como los diferentes sectores de la sociedad involucrados para enfrentar el impacto en la calidad del aire derivado del crecimiento de la población, la expansión de la mancha urbana y en consecuencia, por el incremento del parque vehicular, las actividades industriales y de servicios (EUM-CAM 2004). Este Programa será revisado bianualmente con objeto de dar seguimiento a las medidas planteadas, con posibilidades de modificar y/o reestructurar aquellas que no sean efectivas e incluir nuevas si fuera el caso. El PROAIRE 2002-2010 tiene el objetivo de proteger la salud humana de los efectos nocivos causados por la contaminación atmosférica en la ZMVM. Por una parte, se requiere reducir los niveles de contaminación del aire que prevalecen en la actualidad hasta alcanzar niveles que aseguren la protección a la salud y por otra evitar que la población, especialmente los grupos más vulnerables se exponga a niveles de contaminación riesgosos (EUM-CAM 2002).

Las especificaciones de la gasolina mexicana oxigenada se publicaron por la Secretaría de Desarrollo Social en el Diario Oficial de la Federación (DOF) del 2 de diciembre de 1994 en la norma ambiental NOM-086-ECOL-1994 (posteriormente NOM-086-SEMARNAT-1994) que estableció que la gasolina de la ZMVM debía tener un contenido máximo de oxígeno de 2% en peso. Con la publicación de la norma 086 se inició el control del contenido de aromáticos, olefinas, benceno y presión de vapor en la gasolina (Garfias & Díaz 2003). Desde que se expidió esta norma han habido mejoras en la calidad de los combustibles mexicanos, se dejó de producir la gasolina *Nova* y se produce ahora la

denominada *Premium*, por lo que el 30 de enero del 2006, la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) publicó en el DOF la norma NOM-086-SEMARNAT-SENER-SCFI-2005, con las especificaciones de los combustibles fósiles para la protección ambiental. La norma establece una reducción paulatina al año 2008 en el contenido de azufre en los combustibles y amplía la extensión de la ZMVM de 18 a 28 municipios conurbados del Estado de México, incluyendo las 16 delegaciones del Distrito Federal. Si se suministran los combustibles con las características fijadas en la norma se reducirán 53,438 toneladas de CO, 4,638 toneladas de HC, 2,298 toneladas de NO_x y 4,283 toneladas de SO₂, (EUM-CAM 2004). Se indica además que el contenido de oxígeno de las gasolinas *Magna* y *Premium* será del 2.7% en peso máximo (equivalente aprox. a 14.9% de MTBE en vol.) en la ZMVM, la ZMG y la ZMM (y en Ciudad Juárez en el periodo invernal: de noviembre a marzo). La gasolina *Premium* consumida en el resto del país, también contendrá el 2.7% de oxígeno en peso, en la *Magna* no aplica este requerimiento (EUM-SEMARNAT 2006). Cabe mencionar que si bien esta norma no especifica expresamente el tipo de oxigenante a emplear, en la Tabla 6 de dicha norma se indica que el método de prueba para determinar el contenido de oxígeno será el ASTM D 4815-00 (2005) para MTBE, ETBE, TAME, DIPE y alcohol teramílico.

El oxigenante que se produce principalmente en las refinerías mexicanas es el MTBE, 4,400 BPD, seguido del TAME, 3,400 BPD. En la ZMVM, las gasolinas *Magna* y *Premium* en conjunto sumaron en 1999 un volumen de 112,000 BPD. En el mismo año se consumieron en el país un promedio de 513,000 BPD de gasolina (Garfias & Díaz 2003).

2.3.4 El uso de etanol como combustible

2.3.4.1 El uso de biocombustibles en México

La NOM-086-SEMARNAT-SENER-SCFI-2005 deja abierta la posibilidad de utilizar otros compuestos oxigenantes diferentes al MTBE tales como el etanol al indicar en la sección 5.2 de especificaciones que: *“El responsable antes de utilizar cualquier otro aditivo o combustible no especificado en esta norma, deberá proporcionar a las autoridades ambientales y de salud información sobre el producto, que permita evaluar las ventajas ambientales del mismo y demostrar que por su uso no se afectarían los sistemas de control de los equipos o de los vehículos, ni se produce ningún efecto nocivo en la salud de la población”*.

El 27 de abril del 2006, el Senado de la República aprobó la Ley para la Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos, abriendo la posibilidad de producir combustibles a partir de la caña de azúcar, el maíz y las plantas oleaginosas. El Senado realizó modificaciones mínimas a la versión de la ley aprobada por los diputados, por lo que se devolvió esa ley a la Cámara Baja, donde tendrá que esperar hasta el otoño para ser ratificada y enviada al Presidente de la República para su firma (Shields & Sarmiento 2006). Mediante la aprobación de esta Ley, el Congreso mexicano ordenó a PEMEX añadir a sus gasolinas, a partir de 2007, al menos 6 por ciento de etanol, un oxigenante que las hace más eficientes y reduce la contaminación (Teorema 2006).

La disposición del Congreso es técnicamente factible, pero se tendrían que adecuar refinerías y la logística para transportar el combustible. Se tendrá que invertir en una nueva red de distribución y desarrollar un proyecto de conversión de plantas de MTBE, lo cual no está contemplado en los proyectos de inversión de PEMEX Refinación. PEMEX no podrá añadir etanol a sus gasolinas a partir de 2007, como se lo ordenó el Congreso, porque carece de recursos para desarrollar la tecnología requerida para mezclarlo con sus combustibles, y la producción es insuficiente (Teorema 2006). La dependencia solicitó, con apoyo del BID y cooperación técnica alemana, dos estudios para determinar el potencial y opciones de uso del etanol en México. (Meré & Córdoba 2006).

México produce al año 5 millones de toneladas de azúcar (Meré & Córdoba 2006), y, cada año se consumen 4 millones de toneladas de este producto. Sobra un millón de toneladas que se venden en el mercado exterior, pero al comercializarlas en el mercado spot (como lo conocen los especialistas) el precio está a expensas de las fluctuaciones que, en este caso, han ido reiteradamente a la baja. La producción de etanol en la zafra 2004-2005 fue de apenas 59.3 millones de litros, pero se consumen 164 millones anuales. El resultado es evidente: necesitamos importar más de 100 millones de litros de alcohol (Calatayud & Jácomel 2003), y en las últimas cinco zafras la producción se contrajo 2.4 por ciento en promedio anual, según estadísticas de la Unión Nacional de Cañeros. La Secretaría de Energía (SENER), confirmó que cubrir las nuevas necesidades de etanol con producción nacional es prácticamente imposible. Además, el costo del maíz y caña de azúcar, dos materias primas para producir el etanol, es elevado (Teorema 2006). La producción actual de etanol en México no alcanza siquiera a cubrir la demanda de mezcla en gasolinas que se consume en las tres principales zonas metropolitanas del país. De acuerdo con un estudio de la SENER, el etanol necesario para oxigenar los 11 mil millones de litros anuales de gasolina que se consumen en México, Monterrey y Guadalajara, es de 648 millones de litros anuales, los cuales tendrían que importarse (Teorema 2006). Se estima que se necesitaría dedicar unas 700 mil hectáreas al cultivo de la caña para producir el alcohol requerido (López-Munguía & Saab 1999).

La Secretaría de Economía dará a conocer el Programa de Competitividad para la Industria Azucarera, que busca diversificar el uso de la caña de azúcar y alentar el uso de biocombustibles, para lo cual se construirán dos plantas de etanol. También se considerarán plantas de etanol con trigo y maíz como materia prima (Meré & Córdoba 2006). La Fundación Emisión, organización creada por un grupo de ciudadanos preocupados en la promoción de este tipo de energéticos, promotora de la iniciativa en el Congreso, dijo que para satisfacer la demanda inicial de etanol para las zonas metropolitanas se requieren cuatro plantas biorrefinadoras con capacidad de 150 millones de litros al año cada una. La incorporación de 6 por ciento de etanol por cada litro de gasolina permitirá reducir la emisión de monóxido de carbono en las zonas metropolitanas hasta 30 por ciento. De acuerdo con el estudio de la SENER, si dichas plantas obtuvieran etanol a partir de la caña de azúcar, se requeriría aumentar 18 por ciento al año la producción de este cultivo. Sin embargo, el precio que obtendrían los cañeros en un ingenio sería mucho más alto que en una biorrefinadora (Teorema 2006).

El Presidente electo, Felipe Calderón, hizo durante su campaña, una serie de propuestas específicas referentes al tema de los biocombustibles (Calderón 2006):

1. Uso de ETBE (oxigenante a base de etanol) en lugar de MTBE (oxigenante a base de metanol) como oxigenante de gasolina.
2. Incentivar la producción de etanol a base de caña de azúcar.
4. Encontrar alternativas a los aditivos y oxigenantes para gasolinas que promuevan la industria cañera.
5. Preparar el ajuste de la industria automotriz, que tiende a abandonar el MTBE y a usar el ETBE como oxigenante.
6. Analizar la viabilidad de utilizar mezclas de etanol y gasolina en el mediano plazo, ampliando el uso del etanol.
7. Preparar a la industria cañera para cubrir un crecimiento potencial en la demanda de etanol.

En México, las gasolinas son oxigenadas en un 6 por ciento con MTBE, el cual es importado en su mayor parte. Si se empieza a producir etanol en el país, se podría sustituir las importaciones de MTBE, permitiendo el ahorro de una cuantiosa cantidad de recursos (más de 100 millones de dólares al año) que actualmente se gasta en la importación de este producto (Shields & Sarmiento 2006). Antes de oxigenar las gasolinas con etanol, habría que estudiar también los riesgos de corrosión, en particular en los autos viejos, donde además los componentes de plástico se rigidizan o temperizan. Aún más, la mezcla etanol-gasolina a diferencia de la mezcla MTBE-gasolina, no puede hacerse desde la refinería, sino que debe efectuarse en los puntos más cercanos a la estación de servicio (Shields & Sarmiento 2006).

Uno de los problemas que tiene la producción de alcohol es la vinaza que trae aparejada su elaboración. Se estima que por cada litro de alcohol se producen 14 litros de vinaza. El problema es que este residuo suele ser un elemento altamente contaminante. En concentraciones muy altas, la vinaza mata la fauna y contamina los ríos; sin embargo, se puede aprovechar. Antes de cancelar la producción de alcohol debido a los efectos contaminantes de la vinaza asociada, se ha de buscar aprovechar justamente este compuesto. Se han encontrado al menos dos caminos para aprovechar la vinaza. El primero de ellos consiste en elaborar metano, un biogás que puede utilizarse como combustible y con el que, incluso, se puede llegar a generar electricidad. La otra opción es secar la vinaza para producir un polvo rico en nutrientes que resulta ser un extraordinario fertilizante. De esa manera, la vinaza no sólo no contamina sino que mejora los suelos (Calatayud & Jácomel 2003).

2.3.4.2 Bioenergéticos en Brasil

Brasil es, desde hace años, el líder mundial en la producción de etanol utilizado como carburante para vehículos automotores. Allí son cada vez más comunes los vehículos que usan un combustible “flexible” (flexfuel), que puede ser 85 por ciento etanol obtenido de los cultivos y 15 por ciento gasolina, mientras que otros vehículos usan mezclas de 25 por ciento de etanol y 75 por ciento gasolina. Brasil produjo más de 15 mil millones de litros de etanol en el 2004 a partir de la caña de azúcar (Shields & Sarmiento 2006). El uso a gran escala de etanol como combustible alternativo para vehículos de combustión interna se inició con la crisis petrolera de 1973, y plantea una interesante alternativa: resolver las deficiencias en energéticos provenientes del petróleo con la disponibilidad de superficie

agrícola. Para finales de la década pasada se alentaba el proyecto gasohol: 600 destilerías produciendo 3 mil 300 millones de galones al año (sólo 45 millones en 1976), más de 4 millones de autos funcionando exclusivamente con etanol, y otro porcentaje importante con mezclas de gasolina y etanol. En la década de los noventa el proyecto se vio seriamente afectado por asuntos de política económica: al problema inflacionario, de aumento de reservas petroleras y de requisitos de subsidio al etanol para mantener su competitividad con la gasolina, se sumó el aumento al precio del azúcar en el mercado internacional. El gobierno de Brasil no pudo convencer ni obligar a los dueños de los complejos azucareros a seguir elaborando etanol. Los azucareros brasileños prefirieron entonces exportar el dulce que entregarlo a Petrobras. La compañía petrolera brasileña empezó a operar con pérdidas y desde 1990 Brasil inició importaciones de etanol y metanol de los Estados Unidos. El proyecto vive actualmente la crítica situación originada por los fluctuantes precios del petróleo, y la falta de políticas oficiales para respaldar a una industria que hace al país autosuficiente energéticamente, además con una tecnología renovable y ciertamente sustentable (Shields & Sarmiento 2006).

Otro aspecto muy negativo fue el desperdicio que se hacía de buena parte de la caña y el destino de los desechos originados al elaborar el etanol. Por ejemplo, contaminaban los ríos y se “acidificaban” las áreas donde era depositado el bagazo (Restrepo 2006). Durante el gobierno anterior se tomó la decisión de impulsar la política de doble energía automotriz, que permitía a las nuevas unidades contar con sistemas para utilizar etanol e hidrocarburos. El éxito fue inmediato y no significó aumento en el precio de las unidades, que al año suman más de un millón (Restrepo 2006).

Hoy en día Brasil produce alrededor de 20 millones de toneladas de azúcar contra cinco que se producen en México. Es primero a nivel mundial. Pero lo más importante es la infraestructura que tienen, que lo mismo pueden producir gasolina que etanol, o solamente azúcar (Calatayud & Jácomel 2003). La producción de azúcar en Brasil para la zafra 2005-2006 está estimada en 26.7 millones de toneladas; la de alcohol en 17 mil millones de litros. La experiencia en este país indica que las variaciones en precios del etanol están sujetas a diversos factores que deben ser superados. Entre éstos se encuentran las cambiantes condiciones climáticas, la falta de producción en periodos entre zafras y aún los de tipo político y de corrupción en el mercado (Shields & Sarmiento 2006).

2.3.4.3 Los biocarburantes en Estados Unidos

Ahora otros países piensan en la conveniencia de producir etanol derivado de la caña de azúcar y el maíz. Es el caso de Estados Unidos, donde Chrysler acaba de anunciar que producirá a partir de 2008 unos 500 mil vehículos al año que se moverán con dicho energético (Restrepo 2006). Estados Unidos ha incrementado en forma acelerada su producción de etanol a partir del maíz, la cual alcanzó 8 mil 500 millones de litros en el 2005. Se prevé que su producción podría incluso igualar o superar la de Brasil en poco tiempo (Shields & Sarmiento 2006).

Una mezcla de 7.7 por ciento de volumen de etanol en la gasolina cumple con los requerimientos de 2.7 por ciento de peso de oxígeno que ahora se establece en la normatividad norteamericana, si bien es común mezclarlo en una proporción de 10 por

ciento, que proporciona un peso de oxígeno del 3.5 por ciento. El crecimiento de la producción de etanol carburante en Estados Unidos se comenzó a dar con el objeto de aprovechar los excedentes de maíz, habiéndose establecido una política nacional de apoyo a la agroindustria, pensando, a la vez que esto ayudaría a no depender tanto del petróleo importado. Mientras tanto, el biodiesel ya se expende en más de 1,000 estaciones de servicio de la Unión Americana (Shields & Sarmiento 2006). En Estados Unidos se produjeron en 1997 más de mil millones de galones de etanol, pero no se emplea azúcar de caña, sino glucosa, proveniente de la transformación del almidón de 455 millones de bushels (16 millones de m³) de maíz. Sin embargo, aún en Estados Unidos el etanol es más caro que la gasolina, dados los costos actuales del maíz. Ahora se busca reducir costos a través de la biotecnología moderna: por ejemplo, un proceso más eficiente empleando *Escherichia coli*, una bacteria cuyas vías metabólicas han sido optimizadas mediante ingeniería genética, para que pueda emplear no sólo azúcar de caña o glucosa del maíz, sino también productos de la hidrólisis de la celulosa y la hemicelulosa presentes en la paja, el bagazo y otros subproductos agrícolas, transformándolos en alcohol. En tanto, para hacer atractivo el proyecto de oxigenar las gasolinas con aditivos renovables, aprovechando al mismo tiempo los excedentes de maíz, en Estados Unidos se subsidia al etanol con más de 54 centavos de dólar por galón, lo que cuesta, por ejemplo, a los habitantes de California más de 60 millones de dólares en impuestos al año. Pero el subsidio no sólo es a los costos de producción: también es al ambiente, ya que se ha demostrado que al añadir 10 por ciento de alcohol a la gasolina aumenta en 15 por ciento la presión de vapor de la mezcla. Esto es, aumenta la volatilidad del combustible, lo que ocasiona su presencia en la atmósfera. Esto ha forzado a que en Estados Unidos se otorgue una especie de dispensa para que la gasolina con 10 por ciento de etanol pueda cumplir con los requisitos que marca la legislación para las gasolinas (Clean Air Act). Otro elemento que requiere atención es el efecto de los productos de la oxidación incompleta del etanol, aldehídos y cetonas, que también vendrían a añadirse a los compuestos de la atmósfera (Shields & Sarmiento 2006).

2.3.4.4 Los biocombustibles en otros países

Los congresos de Argentina y España promulgaron un nuevo marco legal para impulsar los bioenergéticos y el Fondo de las Naciones Unidas para la Agricultura (FAO) arrancó un programa de promoción a nivel mundial, sobre todo en las naciones en vías de desarrollo donde las alzas en el precio del petróleo pueden llegar a tener un efecto económico devastador. En España, se manejan mezclas de hasta 5 por ciento de etanol en la gasolina. En Suecia, se cuenta con autobuses que utilizan etanol al 95 por ciento con gasolina (Shields & Sarmiento 2006).

2.4 Principales características de cada familia de sustancias oxigenantes

La Tabla 2.2 lista las características de algunos de los éteres y alcoholes que potencian el octano de los combustibles. Aquellos comúnmente usados en las refinerías mezclados en las formulaciones de gasolina son MTBE, ETBE, TAME y etanol. El metanol y el TBA están actualmente descontinuados. El DIPE y el *tert*-amil etil éter (TAEE) son posibles candidatos futuros (Ancillotti & Fattore 1998).

2.4.1 Alcoholes

En general, los alcoholes en bajas concentraciones tienen la desventaja de incrementar la presión de vapor de la gasolina, por lo que las mezclas gasolina-alcohol tienden a acentuar las emisiones evaporativas, a menos que se utilice una gasolina con un contenido reducido de butanos y pentanos. La cantidad de agua que contiene la gasolina es mínima y equivale a la de saturación del proceso de refinación y si se llegase a separar en dos fases, el agua se drena en los tanques de almacenamiento de la refinería. Sin embargo, los alcoholes tienen la desventaja de ser sustancias higroscópicas que incorporan la humedad atmosférica a las mezclas gasolina-alcohol, con la consiguiente separación de dos fases: una acuosa y la otra constituida por gasolina cuando se rebasa cierta concentración de agua. Existe la alternativa costosa de utilizar cosolventes al adicionar alcoholes para evitar el problema de separación de fases (Garfias & Díaz 2003).

Metanol. La alta volatilidad del metanol mezclado con la gasolina y la formación de azeótropos con HC, causó su rechazo en el mercado. Actualmente el metanol es uno de los reactivos para producir MTBE y otros metil éteres (Ancillotti & Fattore 1998). Otro inconveniente que se presenta con el uso de metanol es que ataca químicamente a algunos de los elastómeros que se usan en el sistema de admisión de combustible. Asimismo, existe la posibilidad de que incremente la formación de gomas y la presencia de depósitos en el sistema de admisión. El excesivo desgaste que origina la mezcla metanol-gasolina hace necesario el uso de aceites lubricantes de alta calidad. El metanol y etanol se obtienen por fermentación de productos agrícolas y sintéticamente a partir del petróleo. Las materias primas petroquímicas más convenientes para fabricar metanol y etanol son respectivamente el gas de síntesis y el etileno. El gas de síntesis se elabora al reaccionar el gas natural con vapor de agua; el etileno al deshidrogenar el etano. México tiene plantas de metanol en San Martín Texmelucan (Garfias & Díaz 2003).

Etanol. Es producido en México por la fermentación de azúcar, melaza o mieles incristalizables provenientes de la caña de azúcar; en EUA al fermentar el almidón del maíz y en otros países de la remolacha y puesto en el mercado en forma anhidra. Al presente, el costo de producción a partir de maíz u otra biomasa valiosa no permite que el etanol sea competitivo en el mercado de los combustibles y hasta ahora este no puede competir sin subsidios. El etanol, además de ser usado como un agente directo de mezclado, es una materia prima para la producción de ETBE y se espera que mantenga este estatus dual (Ancillotti & Fattore 1998). La gasolina reformulada con etanol no puede ser distribuida a través de las tuberías debido a que el agua presente en las líneas causaría que el etanol se separara de la gasolina; así es que las terminales necesitarían áreas de almacenamiento para el etanol de mezclado (Fiorenza & Rifai 2003).

2.4.2 Éteres

Los éteres se obtienen al hacer reaccionar un alcohol con una olefina –ambos de bajo peso molecular- en presencia de una resina intercambiadora de iones. Los alcoholes de bajo peso molecular que se utilizan en la fabricación de éteres son el metanol, etanol e isopropanol y las olefinas corresponden al propileno, isobutileno y amileno. Desde el punto de vista ambiental, los éteres reducen las emisiones de escape y las evaporativas. Además, en el

Tabla 2.2 Propiedades químicas de oxigenantes selectos.

Nombre Químico	Metil <i>tert</i> -Butil Éter	Etil <i>tert</i> -Butil Éter	<i>tert</i> -Amyl Metil Éter	Diisopropil Éter
Registro CAS No.	1634-04-4	637-92-3	994-05-8	108-20-3
Sinónimos	MTBE; 2-metil, 2-metoxi propano; <i>tert</i> -butil metil éter; metil <i>tert</i> -butil éter; metil- <i>tert</i> -butil éter	ETBE; 2-metil, 2-etoxi propano; <i>tert</i> -butil etil éter; 1, 1-dimetil etil éter	TAME; 2-metoxi-2-metilbutano; metil <i>tert</i> -pentil éter; 1,1-dimetilpropil metil éter; metil <i>tert</i> -amil éter	DIPE; 2,2-oxibispropano; 2-isopropoxi-propano
Peso Molecular (g/mol)	88.15	102.18	102.18	102.18
Fórmula Molecular	C ₅ H ₁₂ O	C ₆ H ₁₄ O	C ₆ H ₁₄ O	C ₆ H ₁₄ O
Fórmula Estructural	CH ₃ OC(CH ₃) ₃	(CH ₃) ₃ COCH ₂ CH ₃	CH ₃ CH ₂ C(CH ₃) ₂ OCH ₃	(CH ₃) ₂ CHOCH(CH ₃) ₂
Punto de Ebullición (a 760 mm Hg)	55.2 °C	72.2 °C	86.3 °C	68.2 °C
Presión de Vapor (mm Hg a 20 °C)	240	130	75	159
Octano Camino	110	112	105	105 ¹
Oxígeno (% en peso)	18.15	15.66	15.66	15.66
Densidad (g/ml a 20 °C)	0.74	0.74	0.77	0.73
Solubilidad (g/100 g agua)	4.8	1.2	1.2	0.2
Solubilidad en agua (de gasolina) (g/100 g agua) ²	0.55 0.34	0.33 0.10	0.24 0.12	0.08 0.07
Hc ^a				
Atm·m ³ /g·mol Adimensional a 25 °C	5.28 x 10 ⁻⁴ a 3 x 10 ⁻³	2.64 x 10 ⁻³	1.95 x 10 ⁻³	4.77 x 10 ⁻³
Log K _{oc} ^b a 25 °C ³	1.035-1.091	0.95-2.20	1.27-2.20	1.46-1.82
Log K _{ow}	0.94 a 1.30	ND	ND	1.52
Umbral de sabor en agua (mg/L)	20-40	47	128	ND
Umbral de olor (ppm)	0.053	0.013	0.027	ND

ND: No Disponible; a) Hc: Constante de la Ley de Henry; b) K_{oc}: Coeficiente de partición de carbono orgánico; c) Coeficiente de partición octano-agua

Fuente: Datos adaptados de U.S. EPA (1998c)

- 1 Datos de Ancillotti & Fattore (1998)
- 2 Datos de U.S. EPA (2004)
- 3 Datos de Deeb *et al.* 2003

Tabla 2.2 Propiedades químicas de oxigenantes selectos (continuación)

Nombre Químico	<i>tert</i> -Amil Étil Éter	Dimetil Éter	<i>tert</i> -Butanol	Etanol
Registro CAS No.	919-94-8	115-10-6	75-65-0	64-17-5
Sinónimos	TAAE; etil <i>tert</i> -amil éter; 2-metil, 2-etoxi-butano	DME; oxibis metano,	TBA; <i>tert</i> -butil alcohol; 2-metil, 2-propanol,	etanol; etil alcohol
Peso Molecular (g/mol)	116.20	46.07	74.12	46.07
Fórmula Molecular	C ₇ H ₁₆ O	C ₂ H ₆ O	C ₄ H ₁₀ O	C ₂ H ₆ O
Fórmula Estructural	CH ₃ CH ₂ C(CH ₃) ₂ OCH ₂ CH ₃	CH ₃ OCH ₃	(CH ₃) ₃ COH	CH ₃ CH ₂ OH
Punto de Ebullición (a 760 mm Hg)	102 °C	-24.8 °C	82.4 °C	78.5 °C
Presión de Vapor (mm Hg a 20 °C)	ND	758 a 5086 ^d	41	44
Octano Camino	105 ¹	ND	100	115
Oxígeno (% en peso)	13.77	34.73	21.59	34.73
Densidad (g/mL a 20 °C)	0.75	0.66	0.79	0.79
Solubilidad (g/100 g agua)	ND	4.7 a 35.3	miscible	miscible
Solubilidad en agua (de gasolina) (g/100 g agua) ²	ND	ND	2.5	5.7
Hc ^a				
Atm·m ³ /g·mol	ND	4.89 x 10 ⁻⁴ a 9.97 x 10 ⁻⁴	1.21 x 10 ⁻⁵	6.91 x 10 ⁻⁶
Adimensional a 25 °C	ND	2.03 x 10 ⁻² a 4.15 x 10 ⁻²	4.8-5.9 ² x 10 ⁻⁴	2.83 x 10 ⁻⁴
Log K _{oc} ^b a 25 °C ³	ND	-0.29	1.57	0.20-1.21
Log K _{ow} ^c	ND	0.10	0.35	-0.32
Umbral de sabor en agua (mg/L)	ND	ND	ND	ND
Umbral de olor (ppm)	ND	ND	21	49

ND: No Disponible; a) Hc: Constante de la Ley de Henry; b) K_{oc}: Coeficiente de partición de carbono orgánico; c) Coeficiente de partición octano-agua; d) a 25°C;

Fuente: Datos adaptados de U.S. EPA (1998c)

4 Datos de Ancillotti & Fattore (1998)

5 Datos de U.S. EPA (2004)

6 Datos de Deeb *et al.* 2003

proceso de elaboración de los éteres intervienen compuestos olefinicos que son sumamente fotorreactivos, que al ser sustraídos de las corrientes originales de gasolina catalítica, representa en sí, una ventaja adicional (Garfias & Díaz 2003).

MTBE. Se obtiene a través de la reacción de isobutileno y metanol en la presencia de calor y un catalizador (Figura 2.2).

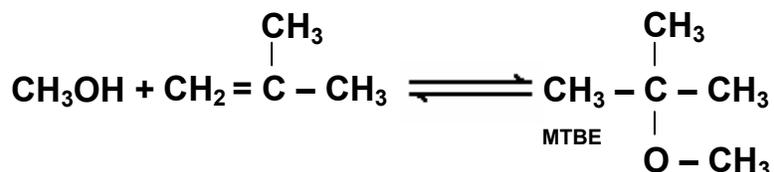


Figura 2.2 Síntesis de MTBE a partir de isobutileno y metanol (tomado de Ancillotti & Fattore, 1998).

La demanda creciente de MTBE ha sido por largo tiempo condicionada por la disponibilidad de isobutileno. En los 70s, el isobutileno venía de las corrientes de C₄ de los procesos de cracking catalíticos para la producción de gasolina y de la manufactura del etileno. En ambos casos el tamaño de planta y las condiciones de operación fueron seleccionados para alcanzar objetivos diferentes de la optimización de la producción de la corriente de C₄. Una contribución sustancial a la disponibilidad de isobutileno vino de cambiar el uso del TBA, (un subproducto de la síntesis de óxido de propileno) como oxigenante de la gasolina (Oxynol: mezcla de TBA y metanol comercializada por la compañía ARCO) hacia el mercado de MTBE, usándolo como un intermediario en la manufactura de isobutileno. Actualmente la principal vía de producción de isobutileno es a través de la deshidrogenación de isobutano. La disponibilidad de metanol es un elemento clave en la manufactura de MTBE, pero a diferencia del isobutileno, el metanol es extensivamente producido en muchos sitios a partir de gas natural barato u otras fuentes de carbono (Ancillotti & Fattore 1998).

El punto de ebullición del MTBE (55.2 °C) y su presión de vapor (240 mm de Hg a 20 °C) son compatibles con la mezcla de hidrocarburos de la gasolina. De este modo, puede ser exitosamente transportado en camiones cisterna o por tuberías. La solubilidad del MTBE en agua (del rango del 5% en masa), es alrededor de 20 veces mayor que la del componente más soluble de la gasolina: el benceno (Braids 2001).

ETBE y TAEE. Los etil homólogos del MTBE y el TAME se producen por la adición de etanol respectivamente a isobutileno y amilenos reactivos (Figura 2.3). Los etil éteres muestran ligeramente mejores propiedades de octano en mezclas con gasolina que los metil éteres y más bajas RVP lo que favorece el mezclado con más butanos de bajo costo. La alternativa del uso de metil o etil éteres dependerá principalmente de la disponibilidad y precio de los dos alcoholes. Al presente, el TAEE no está en el mercado, mientras el ETBE es producido en varios países (EUA y Europa) (Ancillotti & Fattore 1998).

TAME. Se obtiene por la reacción de metanol con una de las dos olefinas ramificadas C₅ (2-metil-2-buteno, 2M2B y 2-metil-1-buteno, 2M1B, Figura 2.4). La tercera olefina ramificada C₅, 3-metil-1-buteno, es completamente inerte hacia la reacción con metanol (Ancillotti & Fattore 1998).

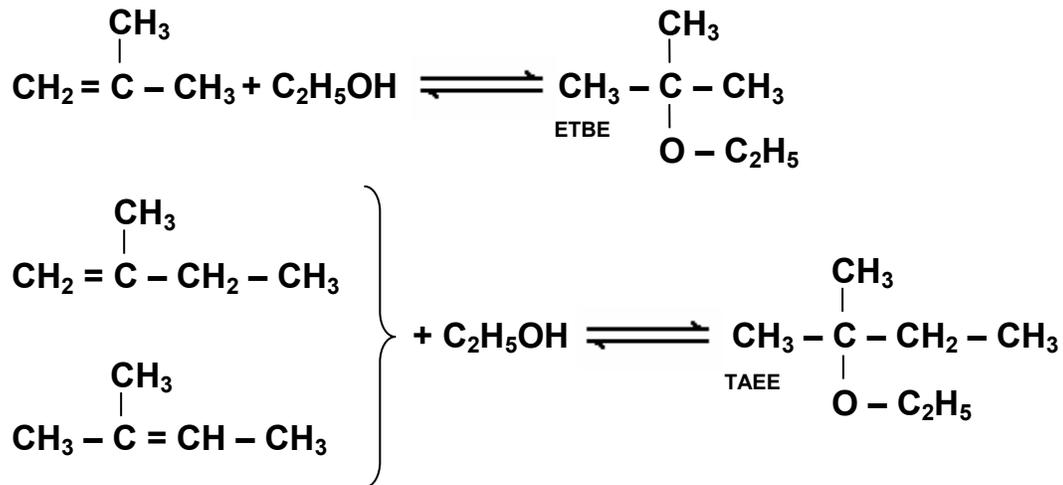


Figura 2.3 Síntesis de ETBE y TAE a partir de isobutileno o amilenos respectivamente y etanol (tomado de Ancillotti & Fattore, 1998).

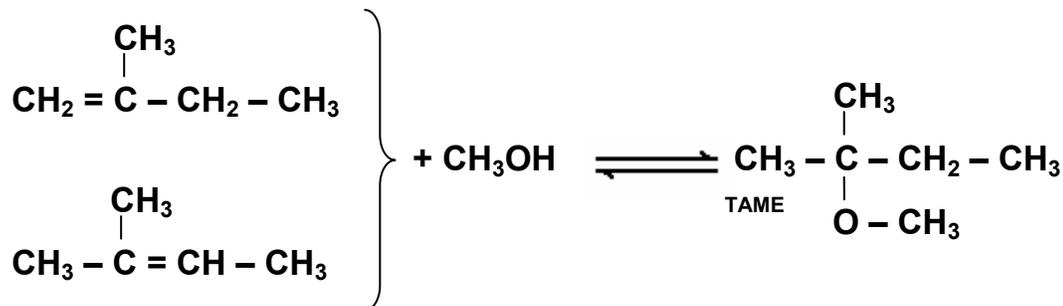


Figura 2.4 Síntesis de TAME a partir de metanol y olefinas ramificadas (tomado de Ancillotti & Fattore, 1998).

A diferencia del MTBE y a pesar de su buena calidad de octano, el TAME no es un verdadero elevador de octano, porque normalmente se produce a partir de dos olefinas de alto octano presentes en el pool de gasolina, que se encuentran en el frente terminal del cracking catalítico de la gasolina. La contribución neta del TAME al octano corresponde por lo tanto a la diferencia entre la contribución al octano del TAME producido y la pérdida en la contribución de octano de los reactivos isoamilenos (Ancillotti & Fattore 1998).

2.5 Contaminación por MTBE

Se han realizado muchos estudios acerca de las emisiones vehiculares de combustibles reformulados, pero se ha dedicado relativamente poca atención al destino ambiental de los oxigenantes solubles en agua (alcoholes y éteres) de los derrames de gasolina en el ambiente. En contraste numerosos estudios en la literatura científica sobre aguas subterráneas discuten el transporte y la biodegradabilidad de los hidrocarburos más solubles en agua (p. ej. Benceno, tolueno y xilenos) de derrames de combustible. En general, el MTBE puede migrar a la subsuperficie con los otros más de 200 componentes de la gasolina durante la refinación, distribución y almacenamiento de combustibles oxigenados (Salanitro 1995, Stocking *et al.* 2000).

Una vez liberado al ambiente, el MTBE presente en la gasolina se disuelve en el agua del suelo y migra a los mantos freáticos con mínimo de retardo. Frecuentemente se observa que en las plumas originadas con gasolina, el MTBE es el único contaminante en el borde de la pluma después de que ésta se ha movido varias decenas o centenas de pies. Así, en una gran mayoría de sitios donde se liberó gasolina, la longitud de las plumas de BTEX tiende a estabilizarse y se extiende a menos de 260 pies del sitio de liberación. Cuando gasolina que contiene MTBE es liberada, las plumas de BTEX pueden aún estabilizarse en un promedio de 300 pies de la fuente pero el MTBE continuará migrando. Debido a que los hidrocarburos están sujetos a biodegradación y retardo en la subsuperficie, se requiere una masa mucho más grande de hidrocarburos que de MTBE para crear una zona contaminada (Braids 2001, Stocking *et al.* 2000).

Aunada a la alta movilidad del MTBE en la subsuperficie está su resistencia a la descomposición por medios químicos o biológicos. Mientras la biodegradación es casi universal para los hidrocarburos asociados con la gasolina en mantos freáticos, el MTBE no es significativamente afectado por los microorganismos. La oxidación química con peróxido, ozono, perácidos, reactivo de Fenton y otros oxidantes puede ser efectiva, pero puede requerir condiciones controladas que no son fáciles o posibles de alcanzar *in situ*. Los tratamientos simples tales como el arrastre con aire (air stripping) a la adsorción con carbón, no son muy efectivos (Braids 2001).

No hay suficientes datos acerca del impacto ambiental de otros oxigenantes, pero los expertos creen que el ETBE, TAME y DIPE se comportarían del mismo modo que el MTBE una vez que sean liberados al ambiente (Nadim *et al.* 2001).

La intención original de la inclusión del MTBE en la gasolina, como un medio de mejorar la calidad del aire, ha sido cuestionada debido a la preocupación por su detección en pozos de agua potable, cuerpos de agua y en aguas subterráneas (Fiorenza & Rifai 2003).

El estado de California inició en 1996 un análisis atmosférico de MTBE. Se encontró que la concentración promedio de MTBE en la atmósfera del estado es de aproximadamente 2 partes por billón (ppb, se refiere a partes por mil millones), con las mayores concentraciones cercanas a 4 ppb en la costa sur, rebasando el límite de detección que es de 0.2 ppb. La preocupación actual relacionada con los oxigenantes se adscribe a la contaminación de algunos mantos acuíferos y de recursos de agua potable debida

principalmente a fugas de gasolina reformulada con MTBE proveniente de Tanques Subterráneos de Almacenamiento (Underground Storage Tanks USTs) y de la tubería de distribución asociada. Pudiera ser que la contaminación de aguas superficiales como lagos y presas se derive del uso de lanchas motorizadas o de descargas de agua que arrastran derrames superficiales de gasolina, o de la atmósfera, a causa de la lluvia (Garfias & Díaz 2003). La presencia de MTBE en aguas subterráneas y en agua potable en otras partes de EUA es ahora relativamente extendida (Erdal & Goldstein 2000).

El MTBE puede ser detectado a 2.5 ppb para el olor y 2.0 ppb para sabor, por lo que su presencia ocasiona problemas de sabor y olor en agua potable. El Departamento de Salud y Seguridad de California propuso un nivel máximo secundario de 5 ppb para MTBE (Fiorenza & Rifai 2003).

En noviembre de 1998, la U.S. EPA anunció la creación de un panel independiente llamado el Panel del Listón Azul compuesto por notables expertos en salud pública y expertos científicos representantes de la industria de combustibles automotrices, representantes de los gobiernos federal y estatales y de suministro de agua. El Panel tuvo como propósito investigar los asuntos de la calidad del agua y el aire asociados con el uso de oxigenantes en la gasolina. El Panel del Listón Azul se reunió seis veces entre enero y junio de 1999 y entregó un reporte con sus recomendaciones. En resumen recomendó mejoras a los programas de protección del agua de la nación, reducción en el uso del MTBE, remoción por el Congreso de los requerimientos de la Ley de Aire Limpio de 2% en peso de RFG consistente de oxígeno, y también que la EPA actuara para retener las mejoras a la calidad del aire resultantes del uso de MTBE (Fiorenza & Rifai 2003, Nadim *et al.* 2001).

Varios estados han actuado contra el uso de MTBE en gasolina. Una orden ejecutiva del Gobernador de California llevó a la remoción del MTBE para el 31 de diciembre del 2002. Arizona, Kansas, Missouri, Nueva York y Dakota del Sur han propuesto ya sea prohibir o limitar el uso del MTBE (Fiorenza & Rifai 2003).

La decisión de prohibir al MTBE en California para finales del 2002 vino principalmente de la evidencia de la degradación de la calidad de aguas subterráneas y agua potable por el MTBE en gasolina oxigenada. Actualmente la mayor preocupación es por la palatabilidad del agua potable más que por impactos adversos a la salud, aunque hay insuficientes datos de toxicidad acerca de los efectos potenciales de la ingesta de MTBE. Esto es reconocido en cada una de las recomendaciones de prohibición. El Programa de Aseguramiento Nacional de la Calidad del Agua (National Water Quality Assessment Program: NAWQA) conducido por la Inspección Geológica de los EUA (United States Geological Survey USGS) encontró que el MTBE se detectó a una frecuencia de 16.9% en pozos en áreas urbanas y 3.4% en pozos de áreas rurales. Los estudios de la USGS demostraron que, a pesar de la frecuente detección de MTBE en los suministros de agua potable de la nación, la gran mayoría de las detecciones a la fecha han estado por debajo de los niveles de preocupación a la salud pública, siendo solamente 0.3%-1.5% de las detecciones por encima del nivel de umbral de la EPA de 20 ppb. Debido al muy bajo umbral de olor y sabor para el MTBE, los costos asociados con la remediación de agua contaminada y la distribución de agua potable estéticamente aceptable al público pueden ser muy altos (Fiorenza & Rifai 2003).

Sorprendentemente, el litigio y controversia por el MTBE en los EUA no ha impactado su uso en otros países. En su lugar, a pesar de las investigaciones en la Comunidad Europea, muchos países europeos no solo han continuado el uso de este producto, sino que han apoyado el uso incrementado del MTBE como un reemplazo para el benceno y otros compuestos aromáticos (Faulk & Gray 2001).

La decisión oficial de prohibir el MTBE, en el estado de California, y el reciente anuncio del administrador de la U.S. EPA de “comenzar acciones reguladoras enfocadas a la eliminación del MTBE de la gasolina” y de apoyar el uso del etanol, sirve como una seria advertencia de que pronto el MTBE será prohibido en todos los EUA, y probablemente se infiltrará en México también (Schifter *et al.* 2001).

2.6 Efectos nocivos del MTBE en animales y humanos

En 1987, la U.S. EPA dio al MTBE una alta prioridad de estudio debido a su gran volumen de producción, amplia exposición y datos limitados sobre los efectos a la salud a largo plazo. En respuesta se formó una Comisión que realizó extensas pruebas toxicológicas consistentes de un amplio espectro de estudios a corto y a largo plazo en animales. Las pruebas incluyeron estudios de inhalación, de neurotoxicidad aguda y subcrónica, toxicidad del desarrollo, toxicidad reproductiva, toxicidad subcrónica, farmacocinética, genotoxicidad y efecto cancerígeno. Todas las pruebas siguieron las guías de la U.S. EPA y los protocolos estándar, y se realizaron de acuerdo a los principios y procedimientos científicos aceptados. Los resultados de estos estudios muestran que el MTBE tiene una baja toxicidad por inhalación y no se espera que cause efectos adversos a la salud a las bajas dosis en la gasolina a las cuales los consumidores están expuestos, los cuales posiblemente no exceden de 3.88 ppm (14 mg/m³). Los efectos adversos en animales solamente se observan a niveles de dosis muy altos, de miles a decenas de miles de veces más altos que las exposiciones ambientales humanas las cuales la U.S. EPA estima como un promedio anual de 0.07 ppm (0.25 mg/m³). Los datos sobre el modo de acción del MTBE indicaron que hay un nivel de dosis por debajo del cual los efectos adversos no se anticipa que ocurran. Basados en la mayoría de los datos, dosis tan altas como 400 ppm (1440 mg/m³) representa un nivel donde no se observan efectos adversos para animales de prueba. La evidencia demuestra que hay un gran margen de seguridad entre las exposiciones ambientales del MTBE y las dosis a las cuales podrían producirse efectos adversos a los humanos. El MTBE, a los niveles añadidos a la gasolina, no posee un riesgo añadido a la salud humana (Stern & Kneiss 1997).

Por otro lado, algunos estudios han mostrado la formación de tumores en animales expuestos a altas concentraciones de MTBE. Sin embargo, hay alguna duda acerca de la relevancia de estos datos para asegurar el efecto cancerígeno del MTBE en humanos. Los datos existentes derivados de estudios en animales, en relación a toxicidad cancerígena crónica y no cancerígena, son considerados ambiguos e inconclusos. Además, estudios de epidemiología humana no apoyan la clasificación del MTBE como un cancerígeno. Ninguna agencia reguladora nacional o internacional ha clasificado al MTBE como un cancerígeno humano, y los datos de genotoxicidad disponibles sugieren que el MTBE no es

mutagénico. La evidencia sugiere que la ingestión de agua por debajo o cercana al umbral de sabor es poco probable que resulte en efectos adversos a la salud (Woodward 2001).

El Instituto de Efectos a la Salud concluyó en 1996 que “son preocupantes los efectos observados sobre el sistema motor y que a bajas exposiciones existe la posibilidad de afectar funciones complejas del sistema nervioso central”. El MTBE es clasificado como una sustancia neurotóxica. La U.S. EPA concluyó en 1997 que “los datos disponibles apuntan hacia un potencial cancerígeno del MTBE a altas dosis, sin embargo, a bajas dosis los datos no respaldan una estimación cuantitativa de riesgo” (Garfías & Díaz 2003).

De acuerdo con los reportes de la Oficina de Política en Ciencia y Tecnología (Office of Science and Technology Policy, OSTP) de la Casa Blanca, el riesgo de cáncer por exposición a MTBE es significativamente menor que para el benceno, un constituyente menor de la gasolina y más de 100 veces menor que para el 1,3-butadieno, un producto cancerígeno de las emisiones de la combustión incompleta de los combustibles (Nadim *et al.* 2001).

En diciembre de 1997, la Oficina del Agua de la U.S. EPA emitió el reporte: Consejo de Aceptabilidad por el Consumidor y Análisis de los Efectos a la Salud por MTBE. EPA822-F-97-008. El documento no impone ningún requerimiento regulador sobre los proveedores de agua potable; en lugar de esto, recomienda niveles de concentraciones contaminantes que serían aceptados por la mayoría de los consumidores de los suministros públicos de agua potable. Las recomendaciones están basadas primariamente en los umbrales de sabor y olor. El Consejo establece que el agua potable que contenga “... concentraciones en el rango de 20-40 $\mu\text{g/L}$ (ppb) posiblemente evitarían efectos de sabores y olores desagradables...” para la mayoría de la gente. El documento también concluye que hay poca probabilidad de que estas concentraciones de MTBE causaran efectos adversos a la salud debido a que son de 4 a 5 órdenes de magnitud por debajo de las menores concentraciones que causaron efectos a la salud observables en animales. Este margen de exposición está en el rango de márgenes de exposición típicamente proporcionado para efectos cancerígenos en los estándares de agua potable y es mucho más grande que los estándares típicamente proporcionados para efectos no cancerígenos (U.S. EPA 1998a). La EPA de California en 1998 propuso 14 $\mu\text{g/L}$ como la concentración a la cual el riesgo de desarrollar cáncer por exposición oral es uno en un millón (Fiorenza & Rifai 2003).

En 1998, la IARC encontró insuficiente evidencia para establecer si el MTBE posee riesgos para provocar cáncer en humanos (Erdal & Goldstein 2000). Actualmente el MTBE está clasificado dentro del grupo 3 (agentes no clasificados como cancerígenos para humanos) en las monografías de la IARC (IARC 1999a, b).

El MTBE se metaboliza rápidamente sea cual fuere la ruta de exposición. Los metabolitos son el formaldehído y el alcohol *tert*-butílico. La U.S. EPA señala que “aunque útiles para identificar riesgos potenciales, las limitaciones de los estudios no permiten estimar confiablemente el grado de riesgo que el MTBE pudiera representar a los humanos por la contaminación de bajo nivel del agua potable” (Garfías & Díaz 2003).

El MTBE tiene un índice de toxicidad aguda en el rango de bajo a muy bajo, produce de una suave a una moderada irritación de piel y ojos con aplicación directa y no es un sensibilizador de piel. El MTBE fue generalmente negativo en ensayos de genotoxicidad, no fue materno tóxico, embriotóxico o teratogénico y no afectó la fertilidad. Pruebas subcrónicas indicaron que la exposición al MTBE a altas dosis produjo efectos anestésicos transitorios reversible e irritación respiratoria, todos signos típicos de los compuestos tipo éter (Stern & Kneiss 1997).

La exposición al aire ambiental urbano indica que la mayoría de los individuos estarán expuestos a niveles de MTBE, los cuales están por debajo de uno en un millón, inferior al valor que constituye un riesgo para producir cáncer. Más significativa es la producción de formaldehído como un subproducto de la combustión del MTBE. El formaldehído es un cancerígeno humano, basado en suficientes estudios en animales y en humanos (Grupo 1, IARC 1999a, IARC 2004). La combustión del MTBE incrementa las emisiones de formaldehído en estudios controlados de combustión. Aunque las concentraciones observadas de MTBE están por debajo de los niveles de riesgo de cáncer, el incremento potencial de las concentraciones de formaldehído resultaría en la aparición de 380 casos de cáncer por año, negando algunos de los beneficios de la reducción en las emisiones de benceno. Debería notarse que a la fecha, la concentración de formaldehído en varias ciudades californianas no ha mostrado tendencias a la alza desde la introducción del MTBE (Keller *et al.* 1998, Keller & Fernández 1999).

Cuando se consideran los efectos tóxicos, es útil notar que el MTBE ha sido usado para tratar cálculos biliares tanto en el Reino Unido como en los EUA desde hace varios años. Durante el tratamiento un tubo se inserta dentro de la vesícula biliar a través del cual el MTBE es aplicado. El MTBE disuelve mucha de la grasa contenida en el cálculo causando que se desintegre. Una revisión de los efectos de este tratamiento en 761 pacientes tratados en 21 centros a través de Europa, no encontró efectos tóxicos del MTBE en ninguno de los pacientes (Woodward 2001).

2.7 Tratamiento de MTBE y otros oxigenantes

En la actualidad existen varias tecnologías para remover al MTBE del medio ambiente. El desempeño de un tratamiento es específico del sitio contaminado y depende de muchos factores por lo que es difícil extrapolar los resultados de un sitio a otro. Estos factores incluyen las condiciones del sitio (tales como los tipos de suelo, permeabilidad, conductividad, condiciones redox y grado de heterogeneidad), el diseño de las tecnologías y operación y consideraciones reguladoras, tales como los niveles de limpieza requeridos. Factores adicionales incluyen la duración de la liberación y la distribución de contaminantes en el suelo y aguas subterráneas (U.S. EPA 2004).

Además, en el caso de los oxigenantes como el MTBE se deben tener en cuenta sus características fisico-químicas y de biodegradación: el MTBE es altamente soluble en agua, no es fácilmente sorbido en las partículas orgánicas del suelo y por lo tanto es altamente móvil en aguas subterráneas. No parece biodegradarse fácilmente en la subsuperficie bajo las condiciones naturales de las aguas subterráneas, no causa la cosolvencia de BTEX y

otros compuestos de las RFG y existen poblaciones microbianas cultivadas que pueden biodegradar al MTBE en condiciones de laboratorio, con las que teóricamente pueden crearse sistemas de tratamiento “A ras del suelo” una vez que el contaminante es extraído del subsuelo por alguna técnica apropiada (Brown *et al.* 1997)

En la Tabla 2.2 se describen algunas tecnologías de tratamiento que han sido aplicadas para tratar MTBE y otros oxigenantes en aguas subterráneas, suelo y agua potable.

Tabla 2.3 Tipos de tecnologías usadas para tratar compuestos oxigenantes de combustibles.

Tecnología de tratamiento	Aguas subterráneas	Suelo	<i>in situ</i> o <i>ex situ</i>	Descripción
Aspersión de Aire (Air Sparging)	•		<i>in situ</i>	Inyección de aire a las aguas subterráneas para arrastrar los VOCs.
Extracción de Vapores del Suelo (Soil Vapor Extraction: SVE)		•	<i>in situ</i>	Aplicación de vacío al suelo para extraer VOCs y tratarlos posteriormente usando procesos A ras del suelo.
Extracción Multi-Fases (Multi-Phase Extraction: MPE)	•	•	<i>in situ</i>	Extracción simultánea de VOCs del suelo por SVE y agua subterránea por Bombeo y Tratamiento y su tratamiento posterior usando técnicas A ras del suelo.
Biorremediación <i>in situ</i>	•	•	<i>in situ</i>	Adición de oxígeno y otras modificaciones para estimular y potenciar la biodegradación.
Oxidación Química <i>in situ</i>	•	•	<i>in situ</i>	Inyección de sustancias químicas tales como el ozono, peróxido de hidrógeno o permanganato en el subsuelo para oxidar contaminantes.
Bombeo-y-Tratamiento (Pump- and-Treat) de aguas subterráneas	•		<i>ex situ</i>	Extracción de agua subterránea contaminada para tratamiento previo a su uso o desecho.
Tecnologías de Tratamiento A nivel del suelo (Above-Ground Treatment)	•		<i>ex situ</i>	Tratamiento de agua subterránea contaminada o vapores del contaminante usando procesos <i>ex situ</i> tales como Arrastre con aire (Air Stripping), adsorción, reactores biológicos u oxidación.
Barreras Permeables Reactivas (Permeable Reactive Barriers: PRB)	•		<i>in situ</i>	Colocación de una zona reactiva que trata los contaminantes conforme el agua subterránea fluye a través de la zona.
Fitorremediación	•	•	<i>in situ</i>	Uso de árboles y otras plantas superiores para remover o destruir contaminantes.
Tratamientos Térmicos <i>in situ</i>	•	•	<i>in situ</i>	Uso de calor para movilizar o destruir contaminantes.

Fuente: Adaptado de U.S. EPA (2004)

En el caso de algunos tipos de tratamiento como en la Aspersión de aire, SVE, MPE o Bombeo-y-Tratamiento, una vez que los contaminantes son extraídos en forma de vapor o disueltos en aguas subterráneas, es necesario dirigirlos a un sistema de tratamiento *ex situ* a nivel del suelo antes de que sean descargados a la atmósfera. A continuación se describen algunas de las tecnologías *ex situ* disponibles para tratar MTBE (U.S. EPA 2004).

- Adsorción. Procesos en los cuales los contaminantes en fase vapor son adsorbidos en un medio tal como Carbón Activado Granular (Granular Activated Carbon: GAC) o resina.
- Tratamiento térmico. Procesos en los que los contaminantes en fase vapor son destruidos vía la oxidación a altas temperaturas; las categorías primarias de tratamientos térmicos usados para tratar oxigenantes incluyen oxidación térmica, que emplea una flama para generar las altas temperaturas necesarias para oxidar contaminantes, y oxidación catalítica, la cual emplea bajas temperaturas en

presencia de un catalizador (típicamente platino, paladio) para destruir los contaminantes.

- Arrastre con aire (Air Stripping). Procesos en los cuales los contaminantes son volatilizados desde el agua al aire en un sistema de ingeniería, tales como una torre empacada; puede requerirse del tratamiento posterior del vapor resultante.
- Oxidación química. Procesos en los que los contaminantes son secuencialmente oxidados a productos menos tóxicos a través de la introducción de oxidantes químicos o la creación de condiciones oxidantes a través de otros medios, tales como la radiación ultravioleta (UV), estimulación eléctrica o cavitación.
- Biotratamientos. Procesos en los cuales los contaminantes son biodegradados por microorganismos (bacterias, hongos) en un sistema de ingeniería, tales como un biorreactor de lodos activados o un biofiltro.
 - Biofiltración. Procesos en los cuales los contaminantes son biodegradados en un biorreactor de película fija, consistente típicamente de un lecho de medios filtrantes de elevada área superficial, tales como GAC, que actúa como una matriz de soporte para una delgada película consistente de microorganismos que están aclimatados para degradar MTBE u otros contaminantes.

En el caso de la oxidación química *in situ* y de la biodegradación *in situ*, es necesario hacer adiciones al subsuelo o a las aguas subterráneas para potenciar la oxidación o la biodegradación de los contaminantes.

Las adiciones para la oxidación química *in situ* son: Peróxido de hidrógeno (H_2O_2), Ozono (O_3), Permanganato (MnO_4^-), otros oxidantes (como el persulfato).

Las adiciones para la biodegradación *in situ* son: 1) bioestimulación: adición de aceptores de electrones (el oxígeno es el más común), de donadores de electrones (en el caso de cometabolismo), de nutrientes (nitrógeno, fósforo, etc.) y 2) bioaumentación: la adición de microorganismos capaces de degradar contaminantes específicos.

Los primeros estudios sobre la contaminación de aguas subterráneas con MTBE concluyeron que el compuesto era no biodegradable o muy resistente a la biodegradación. Sin embargo, investigaciones más recientes han mostrado que el MTBE puede ser degradado tanto aeróbicamente como anaeróbicamente, aunque las velocidades anaerobias de degradación intrínsecas son muy bajas. Para los tratamientos biológicos *in situ*, el enfoque primario es la creación de condiciones que estimulen la biodegradación. En el caso de los biotratamientos *ex situ*, la creación de estas condiciones es más simple debido a que los tratamientos ocurren en un sistema definido, controlado y accesible.

A continuación se hace una revisión del estado del arte sobre las investigaciones acerca de la biodegradación del MTBE y de otros oxigenantes, incluyendo sus rutas de biodegradación.

CAPÍTULO III

ESTADO DEL ARTE

3. ESTADO DEL ARTE

3.1 Biodegradación

Para poder evaluar el destino de los compuestos orgánicos liberados al ambiente, es necesario contar con una evaluación realista de su susceptibilidad a mineralización (la conversión a dióxido de carbono, agua, y varias formas inorgánicas). Aunque existen algunos mecanismos abióticos tales como la foto-oxidación, responsables de la transformación de dichos compuestos, pocos de ellos son capaces de convertirlos totalmente en productos inorgánicos y por lo tanto no se consideran de importancia en la naturaleza. Contrariamente a lo anterior, la mineralización se logra frecuentemente como consecuencia de la actividad microbiana. Por lo tanto, el destino ambiental de los compuestos orgánicos es altamente dependiente de la susceptibilidad de las sustancias al ataque biológico.

Los compuestos orgánicos, a menudo se clasifican como biodegradables, persistentes o recalcitrantes. Biodegradación significa la transformación biológica de un compuesto orgánico a otra forma; esta definición no implica ninguna extensión de la transformación. Más aún, la biodegradación no necesita tener un resultado benigno. En su lugar un compuesto inocuo podría convertirse en uno tóxico, un compuesto fácilmente metabolizable en uno que es difícil de destruir, o alterar la toxicidad de una sustancia de modo que actúe contra otro organismo. Se ha definido el término recalcitrancia, como la resistencia inherente de una sustancia a cualquier grado de biodegradación y se ha introducido el término persistencia para significar cuando un compuesto falla en experimentar biodegradación bajo cualquier conjunto de condiciones específicas. Un factor determinante de la aptitud de un compuesto orgánico al ataque microbiano es el tiempo que ha estado en la Tierra. La mayoría de los compuestos naturales (biogénicos) han estado presentes por millones de años, y existen organismos, en algún lugar de la biosfera, que pueden iniciar su mineralización. Muchos de los compuestos que han sido usados por la industria moderna están relacionados a los compuestos biogénicos y son biodegradables. Por otro lado, muchos otros son extraños a la biosfera (xenobióticos), y han estado presentes solamente por un instante en la escala de tiempo evolutiva. Estos poseen el problema de ser extraños en la naturaleza y pueden causar efectos deletéreos en los sistemas vivientes y hacer que se acumulen en el ambiente (Grady 1985).

Los microorganismos pueden hacer sólo aquellas cosas para las cuales tienen capacidad genética y el ambiente determina si una reacción puede llevarse a cabo por un organismo genéticamente capaz de realizarla. En consecuencia, aún para un compuesto biogénico no hay garantía de que la biodegradación pueda ocurrir en un ambiente particular. Primero, un organismo capaz debe estar presente; segundo, debe existir una oportunidad para que las enzimas requeridas sean sintetizadas; y tercero, las condiciones ambientales deben ser suficientes para que la(s) reacción(es) catalizada(s) enzimáticamente procedan a una velocidad significativa. Así, aún para un material biogénico, la biodegradación es un evento altamente específico. Si la capacidad genética de un organismo le permite sintetizar las enzimas requeridas para una biodegradación y si las enzimas son sintetizadas en respuesta a la presencia de un sustrato reconocible, ¿cómo se puede alcanzar la biodegradación de

compuestos xenobióticos? La respuesta a esta pregunta yace en el hecho de que la estereoespecificidad de las enzimas no es exacta. La principal especificidad que exhiben las enzimas es con respecto a su función catalítica, es decir, el tipo de reacción que median. Son mucho menos específicas con respecto al sustrato que enlazan, aunque el grado de especificidad depende de la enzima en cuestión. Por lo tanto, no es insólito que se unan a análogos del sustrato natural los cuales contienen grupos funcionales xenobióticos. Si estos grupos funcionales no alteran grandemente la estructura del sitio activo, entonces es posible que la enzima catalice su reacción específica sobre el compuesto xenobiótico. Esta propiedad de una enzima existente, que muestra actividad catalítica disponible hacia un sustrato nuevo, ha sido llamada metabolismo fortuito o gratuito y se piensa que es un mecanismo principal por el cual los microorganismos atacan compuestos xenobióticos. Si el compuesto xenobiótico es incapaz de causar la inducción de la enzima requerida, entonces su biodegradación solamente ocurrirá en la presencia del inductor natural (Grady 1985).

3.1.1 Cometabolismo

Un caso particular de metabolismo fortuito 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 (resting cells) en la ausencia de un sustrato de crecimiento, o por células en reposo en la presencia de un sustrato de energía. Un compuesto que no sirve como sustrato es definido como aquel que no soporta la división celular, es decir, aquel que no puede servir como la 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).

3.1.2 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.

3.2 Biodegradación de oxigenantes de la gasolina

Aunque la detección del MTBE en aguas subterráneas fue reportada desde 1986, hasta hace relativamente pocos años no había muchos estudios que evaluaran su biodegradabilidad. Mientras los primeros estudios sugerían que el MTBE era resistente al ataque microbiano, bajo condiciones tanto aerobias como anaerobias (Fujiwara *et al.* 1984, Jensen & Arvin 1990, Suflita & Mormile 1993, Horan & Brown 1995), estudios posteriores revelaron que cultivos bacterianos y fúngicos provenientes de varias fuentes ambientales, generalmente

del petróleo o de biorreactores de tratamiento de aguas de desecho en plantas químicas, son capaces de degradar MTBE ya sea como fuente primaria de carbono y energía o cometabólicamente siguiendo el crecimiento sobre otro sustrato (Bradley *et al.* 1999, Deeb *et al.* 2001a, Deshusses 2000, Fortin *et al.* 2001, François *et al.* 2002, Garnier *et al.* 1999, Hardison *et al.* 1997, Hatzinger *et al.* 2001, Johnson *et al.* 2004, Morales *et al.* 2004, Smith *et al.* 2003a, b, Steffan *et al.* 1997, Wilson *et al.* 2002a y otros). Estos estudios incluyen reportes de ya sea la degradación parcial del MTBE a intermediarios metabólicos o su mineralización a CO₂. Adicionalmente, en los últimos años, se han publicado varias revisiones referentes a la biodegradación y biorremediación de MTBE (Deeb *et al.* 2000a, ERG 2000, Fayolle *et al.* 2001, Fiorenza & Rifai 2003, Prince 2000, Stocking *et al.* 2000).

3.2.1 Factores estructurales que dificultan la biodegradación de los oxigenantes

Los experimentos iniciales de biodegradación de MTBE resultaron negativos, y las estructuras químicas de los oxigenantes sugerían que posiblemente eran recalcitrantes a la biodegradación. Así, los carbonos terciarios, tales como en el grupo tert-butilo en el MTBE y ETBE, son invariablemente bastante resistentes a la biodegradación. Suflita & Mormile (1993) determinaron que los oxigenantes con un átomo de carbono terciario fueron más recalcitrantes que los compuestos químicos relacionados sin ramificar o ligeramente ramificados. Por ejemplo, butil metil éter fue degradado pero no el MTBE en sedimentos acuíferos o cultivos bacterianos. Similarmente, los enlaces éter tienden a ser un impedimento a la biodegradabilidad de un compuesto químico. Por ejemplo, la lignina que es el segundo polímero natural más abundante y un compuesto estable, está compuesto de monómeros unidos por enlaces éter (White *et al.* 1996).

Es notable que los microorganismos rompan el enlace éter, debido a que su energía es de 360 kJ. Así, el rompimiento de este enlace requiere una gran inversión de energía, aún cuando los rendimientos de carbono asimilable, a veces son pequeños (White *et al.* 1996). Sin embargo, Finneran & Lovley (2001) calcularon la energía libre de Gibbs de la mineralización del MTBE con una variedad de aceptores de electrones y determinaron que, termodinámicamente, la degradación es posible.

Mecanismos Bioquímicos para el rompimiento del enlace éter. Las principales estrategias bioquímicas que pueden ser adoptadas por microorganismos para atacar enlaces éter incluyen: (i) rompimiento oxigenativo por oxigenasas; (ii) oxidación por citocromos P-450; (iii) transferencia de hidroxilos; (iv) hidrólisis; (v) rompimiento anaeróbico de metil-aril-éteres; (vi) mecanismos oxidativos; (vii) mecanismos reductivos; y (viii) liasas carbono-oxígeno (White *et al.* 1996).

3.2.2 Degradación aerobia por metabolismo directo

Horan & Brown (1995) investigaron la interacción entre MTBE y la degradación de un hidrocarburo alcano representativo: hexadecano, el cual se encuentra en muchos productos del petróleo incluyendo petróleo crudo y gasolina. Estos estudios se realizaron usando protocolos respirométricos. Para estos experimentos se trató de seleccionar un consorcio microbiano capaz de metabolizar MTBE usando técnicas de enriquecimiento. Sus resultados muestran que la cantidad de hexadecano mineralizado decrece como una función

del MTBE añadido. Encontraron además que el consorcio cultivado sin hexadecano, utilizó oxígeno cuando se añadieron pequeñas cantidades de MTBE, sin embargo, no pudieron estabilizar algún consorcio que pudiera utilizar MTBE como la única fuente de carbono, y de hecho encontraron que el enriquecimiento cesó de utilizar O₂ cuando el MTBE alcanzó aproximadamente 10 ppm en el envase de cultivo. Los autores concluyen que es poco probable que el MTBE pudiera servir como la única fuente de carbono para microorganismos.

El primer indicio claro de que el MTBE podía servir como única fuente de carbono y energía para microbios aerobios vino del trabajo de Salanitro *et al.* (1994). Ellos enriquecieron un cultivo mixto heterótrofo BC-1, de los lodos activados de una unidad industrial de una planta química. El inóculo se mantuvo en cultivo continuo y degradó hasta 200 mg/L de MTBE como la única fuente de carbono, a velocidades de hasta 34 mg/g biomasa-h, oxidó NH₄⁺ a NO₃⁻. La nitrificación por alguno de los miembros del cultivo pareció estabilizar la biodegradación del MTBE. Las velocidades de crecimiento (0.01/d) y rendimientos celulares (0.21-0.28 g biomasa/g MTBE) fueron bajos. Se especuló que la baja tasa de crecimiento sobre MTBE era debida al lento metabolismo de un intermediario limitante de la velocidad o a la acción del MTBE como un inhibidor metabólico. BC-1 metabolizó éter radiomarcado (¹⁴CH₃O-MTBE) a ¹⁴CO₂ (40%) y células marcadas con ¹⁴C (40%), la ruta degradativa involucraba TBA.

El primer estudio de biodegradación de MTBE por un cultivo puro fue el presentado por Mo *et al.* (1995). Estos investigadores aislaron 15 cepas bacterianas (siete fueron del género *Rhodococcus*, *Flavobacterium*, *Oerskovia* o *Pseudomonas*) de lodos que podían degradar MTBE como la única fuente de carbono. Estos aislados degradaron 40% de 200 mg/L de MTBE en 2 semanas de incubación a 22-25 °C. Más tarde, Mo *et al.* (1997) aislaron tres cultivos puros, *Methylobacterium mesophilicum* (ATCC 7000107), *Arthrobacter ilicis* (ATCC 700109) y un *Rhodococcus* sp. (ATCC 700108) de muestras de lodos activados, del fruto del árbol del Ginko, y suelo alrededor del árbol, usando MTBE como sustrato de enriquecimiento. El árbol del Ginko fue escogido ya que produce grupos tert-butilos en el fruto. Los tres cultivos mostraron biotransformación 29% de 200 mg/L de MTBE en menos de dos semanas con 8% del MTBE mineralizado a CO₂ en una semana. Las velocidades de degradación de MTBE decrecieron significativamente en la presencia de otras fuentes de carbono incluyendo TBA, *tert*-butil formiato (TBF), isopropanol, acetona y piruvato. Se observaron velocidades de crecimiento lentas en MTBE comparadas con el crecimiento en un medio rico en nutrientes lo cual condujo a los investigadores a concluir que o bien el MTBE era un sustrato de crecimiento pobre o que uno de sus metabolitos podría inhibir el crecimiento del cultivo. Los cultivos pudieron degradar TBA, un intermediario potencial de la oxidación del MTBE.

Cowan & Park (1996) obtuvieron un cultivo degradador de MTBE enriquecido de una planta de tratamiento de aguas residuales de una refinería petrolera. Se biodegradaron cinco compuestos, MTBE, ETBE, TAME, TBA o alcohol *tert*-amílico (TAA) como única fuente de carbono a 30 °C. El TBA fue detectado como un intermediario transitorio en la degradación de MTBE y ETBE. No se observó TAA como un intermediario en la degradación de TAME, presumiblemente porque sus cinéticas de degradación fueron más rápidas que las de TAME. En estudios posteriores, el cultivo mostró que degradaba MTBE

y TBA, y utilizaba ambos compuestos como única fuente de carbono y energía (Park & Cowan 1997a, b). Las máximas velocidades específicas de crecimiento del cultivo en MTBE y otros éteres oxigenantes fueron bajas (0.015-0.06/h) pero en el rango de velocidades previamente reportadas mientras que los rendimientos celulares fueron moderados (0.33-0.43 mg DQO/mg sustrato a 30 °C). Una similitud a resultados previamente reportados por Salanitro *et al.* (1994) fue que el TBA se degradó más lento que el MTBE resultando en la acumulación transitoria de TBA. El consorcio también mostró ser sensible a decrementos en la temperatura con velocidades máximas de crecimiento específico que pasaron de 0.043 a 0.012/h y los rendimientos celulares disminuyeron de 0.41 a 0.33 mg células DQO/mg MTBE DQO cuando las temperaturas decrecieron de 30 a 20 °C. Salanitro *et al.* (1996) determinaron que entre 5 y 90 mg/L de MTBE no afectaron la biodegradación de BTEX, presentes entre 2 y 2.5 mg/L.

Kharoune *et al.* (1997) trataron de obtener microorganismos capaces de degradar eficientemente los oxigenantes de la gasolina: MTBE, ETBE y TAME, e investigaron también la factibilidad de fotodegradación de estos compuestos, ya sea su destrucción parcial o total. Como última meta de este trabajo, combinaron tratamientos microbiológicos y fotoquímicos para obtener una eliminación adecuada de estos compuestos. El tratamiento fotoquímico consistió en tratar las muestras que contenían oxigenantes con radiación ultravioleta combinada con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Sus resultados muestran en cultivos aerobios por lotes una mineralización del ETBE a una velocidad de 4 mg/L·día. En mezclas con otros oxigenantes la velocidad disminuyó a 2 mg/L·día; en la mezcla ETBE-MTBE éste último fue degradado a 1.2 mg/L·día y en la mezcla ETBE-TAME el TAME fue degradado a razón de 1.8 mg/L·día. En los experimentos de tratamiento fotoquímico encontraron degradación nula cuando sólo utilizaron H₂O₂ o UV. El tratamiento H₂O₂/UV tuvo una transformación estable aunque no se logró la completa mineralización. Los intermediarios de la transformación fotoquímica fueron más biodegradables que los oxigenantes. A concentraciones más bajas de peróxido, el ETBE es transformado pero no mineralizado (los subproductos son ácidos y no absorben en UV), sin embargo, aún a la más alta concentración de peróxido, la concentración inicial de ETBE no es completamente mineralizada. El TBA, el etanol y el metanol fueron los principales subproductos generados de la transformación de ETBE. Los estudios con microorganismos tanto aclimatados como no aclimatados al ETBE degradaron más fácilmente los intermediarios de su transformación fotoquímica que al propio ETBE.

Eweis *et al.* (1997) reportaron la remoción de MTBE en un biofiltro de una planta de tratamiento de aguas. Estos investigadores enriquecieron un cultivo mixto del material del biofiltro consistente primariamente de composta que fue capaz de utilizar MTBE para el crecimiento después de una fase lag de alrededor de 1 año. Sus resultados muestran que el cultivo fue capaz de degradar MTBE tanto en una matriz sólida como en medio líquido. Por otra parte los microorganismos parecieron ser más estables en el medio conteniendo nitrato como fuente de nitrógeno comparado con amonio. El pH disminuyó como resultado de reacciones de nitrificación al asimilarse el amonio lo que posiblemente contribuyó a la pérdida de biodegradabilidad en el medio con alta concentración de amonio. Posteriormente, se derivaron algunos cultivos bacterianos del material del biofiltro que mostraron la capacidad de degradar MTBE. La cepa de *Rubrivivax gelatinosus* PM1,

aislada por Hanson *et al.* (1999), demostró que degradaba MTBE como su única fuente de carbono y energía. Cuando se alimentó con ^{14}C -MTBE uniformemente marcado a 20 $\mu\text{g/mL}$, PM1 convirtió 46% a $^{14}\text{CO}_2$ y 19% a células ^{14}C -marcadas en 120 h. El rendimiento biomásico global fue estimado de la producción de proteína a varias concentraciones de MTBE, en 0.18 g biomasa/g MTBE. Un estudio posterior de la cepa PM1 por Church *et al.* (2000) confirmaron la mineralización del MTBE y comprobaron que las velocidades de degradación de TAME, ETBE, DIPE, TBA y TAA fueron del mismo orden de magnitud que la velocidad de degradación del MTBE. Junto con una consistencia en la formación de producto, estos resultados sugieren que sistemas enzimáticos similares son responsables por todas las reacciones.

Fayolle *et al.* (1998) aislaron dos cepas bacterianas aeróbicas que crecen en ETBE: *Gordonia terrae* y *Rhodococcus equi*. Estas cepas podían crecer en ETBE pero no en MTBE y TAME como única fuente de carbono y energía. Ambos microorganismos convirtieron completamente el ETBE a TBA a velocidades de degradación de hasta 380 mg ETBE/g proteína·h. El TBA se mineralizó por el consorcio adaptado a degradar ETBE del cual se aislaron las dos cepas.

Church *et al.* (1999) evaluaron la biodegradación de MTBE en columnas aeróbicas empacadas con materiales acuíferos de tres sitios diferentes. Resultados de este estudio revelaron que el MTBE fue transformado a TBA en cada una de las columnas pero solamente en ausencia de compuestos como los BTEX. La concentración de TBA se incrementó en los efluentes de las columnas con decrementos de las concentraciones de MTBE y oxígeno. Sin embargo no se observó evidencia de degradación de TBA en ninguna columna.

La mineralización de MTBE fue demostrada en estudios en microcosmos usando sedimentos de lechos de dos sitios contaminados con gasolina (Bradley *et al.* 1999). Ambos sitios tenían exposición previa a concentraciones mensurables de MTBE, TBA y compuestos aromáticos, aunque no se detectó contaminación con benceno, MTBE o TBA antes de los experimentos (<5 ppb). Tanto MTBE como TBA fueron fácilmente degradados, la fracción de MTBE mineralizada en microcosmos con sedimentos de ambos sitios estuvo en el rango de 30 a 70% en 105 días. La degradación de MTBE fue menor en el sitio con el más alto contenido orgánico. La mineralización de TBA fue más rápida que la del MTBE con 70% de TBA recuperado como CO_2 en 27 días.

Acuña-Askar *et al.* (1999) evaluaron las cinéticas de remoción y la eficiencia de degradación de MTBE en estudios por lotes (concentración inicial de MTBE de 100 mg/L) y en un reactor de flujo continuo (concentraciones iniciales de 150.1, 118 y 143.3 mg/L para tiempos de retención de 0.25, 0.5 y 1.0 días respectivamente) utilizando un cultivo mixto previamente aislado de lodos activados de una planta de tratamiento de aguas residuales de una industria petroquímica. Entre los microorganismos del cultivo mixto se aislaron 3 cepas: MC-1 (coco Gram-positivo), MC-2 (*Acinetobacter lwoffii*), y MC3 (*Bacillus* sp.) siendo MC-1 el microorganismo predominante. Para estudios por lotes, los autores calcularon mediante un modelo de primer orden, velocidades en el rango de 6.72×10^{-2} a 1.82×10^{-1} /día. Sus experimentos sugieren que la biodegradación de MTBE se

inhibe cuando otras fuentes de carbono fácilmente asimilables como el extracto de levadura, están presentes en el medio de cultivo. Los ensayos en el reactor de flujo ascendente continuo con una biopelícula mostraron una biodegradación del MTBE del 70% para tiempos de retención de 0.5 y 1.0 días y proporcionaron velocidades de remoción más altas que las obtenidas en estudios por lotes.

Fortin & Deshusses (1999a, b) enriquecieron un cultivo mixto en dos biofiltros de lecho escurrido. Se empleó agua subterránea y materiales acuíferos de dos sitios de campo para inocular los filtros a escala de laboratorio. Después de un periodo de aclimatación de 6 meses, los organismos mantenidos en los filtros fueron capaces de degradar hasta 50 g/m^3 reactor-h, sin liberación de productos de oxidación parcial, un valor comparable a las velocidades de remoción de BTEX en sistemas similares. Los organismos convirtieron 97% del MTBE a CO_2 , sugiriendo un metabolismo energético muy pobre. Una regla empírica para la mayoría de los hidrocarburos, es que aproximadamente 50% de conversión se va hacia la formación de biomasa. Se reportó una velocidad de degradación específica de 5 a $10 \text{ mg MTBE/g biomasa}\cdot\text{h}$ y en este caso se reportaron rendimientos celulares entre 0.09 y $0.12 \text{ g peso seco/g MTBE}$, siendo similares a los reportados para cultivos mixtos y puros crecidos en laboratorio (Salanitro *et al.* 1994 mostraron un rendimiento de 0.21 a $0.28 \text{ g peso seco/g MTBE}$). Esto significa que el biofiltro de lecho escurrido tendrá una muy baja velocidad de acumulación de biomasa. Posteriormente, experimentos acerca de la conducta dinámica de los filtros bajo condiciones simuladas de campo mostraron que la remoción de MTBE en los biorreactores estuvo limitada por procesos biológicos más que por transferencia de masa. En un estudio posterior, Fortin *et al.* (2001) caracterizaron un consorcio denominado consorcio F capaz de degradar MTBE en cultivos líquidos. Cuando se añadió MTBE a concentraciones de 100 mg/L , la velocidad de degradación fue rápida y siguió cinéticas de orden cero. La concentración de MTBE residual estuvo en el rango de 1 a $50 \text{ }\mu\text{g/L}$. La actividad específica del consorcio estuvo en el rango de 7 a $52 \text{ mg MTBE/g peso seco}\cdot\text{h}$. En experimentos con radioisótopos, el 79% del carbono se recuperó como $^{14}\text{CO}_2$. El consorcio también fue capaz de degradar TBA, TAME y BTEX. El consorcio se caracterizó por una velocidad de crecimiento muy baja ($0.1/\text{d}$), un bajo rendimiento de biomasa ($0.11 \text{ g peso seco/g MTBE}$), una alta afinidad por MTBE ($K_{m\text{MTBE}} = 17 \text{ }\mu\text{M}$) y una baja afinidad por oxígeno ($K_{m\text{O}_2} = 193 \text{ }\mu\text{M}$). Un rango común de valores de $K_{m\text{O}_2}$ para microorganismos convencionales para los cuales el oxígeno actúa solamente como un aceptor de electrones es de 0.1 a $1 \text{ }\mu\text{M}$ lo cual puede explicar la ausencia de biodegradación de MTBE *in situ*.

Morales *et al.* (2000) estudiaron la conducta de degradación de MTBE por un consorcio obtenido por enriquecimiento en un filtro de lecho escurrido. Sus experimentos se llevaron a cabo tanto en microcosmos (concentración del MTBE de 25 mg/L) como en columnas de vidrio (concentración de entrada de 12 mg/L). Se realizaron experimentos en condiciones tanto aerobias como anaerobias y se evaluó la capacidad de degradación tanto del consorcio inoculado como de la flora microbiana nativa de muestras de suelo y agua subterránea contaminados con MTBE del sur de California. Sus experimentos mostraron que la degradación de MTBE ocurrió solamente en aquellos microcosmos incubados bajo condiciones aerobias e inoculados con el consorcio. No hubo degradación por los microorganismos nativos o en condiciones anaerobias. En microcosmos obtuvieron la

completa degradación (~100%) de 20-25 mg/L de MTBE en 10 días. Observaron además que cuando debido a la actividad de microorganismos nitrificadores se generaba nitrito, el cultivo sufría una desactivación de la degradación de MTBE y suponen que se debe a una alta sensibilidad de los organismos degradadores de MTBE a este ion. En los estudios en columnas obtuvieron eficiencias de remoción cercanas al 100% sobre el rango de cargas de MTBE probadas (0.1-2.5 g/m³·h). La degradación efectiva de MTBE se mantuvo por seis meses.

Landmeyer *et al.* (2001) mostraron que la adición de oxígeno a un acuífero anóxico estimuló eficientemente la biodegradación de MTBE por la población indígena. Estudiaron la biodegradación de ¹⁴C-MTBE (en etanol) en cultivo líquido, usando como inóculo una biopelícula de un acuífero anóxico de un sitio con historial de contaminación con MTBE. Después de 80 días no quedó ¹⁴C-MTBE y 99% del carbono radiomarcado fue recuperado como ¹⁴CO₂. No se observó la acumulación de compuestos intermediarios. La biopelícula pudo haber estado adaptada al MTBE o quizás el etanol (solvente del ¹⁴C-MTBE) indujo las enzimas necesarias para la degradación del MTBE, o fue un cosustrato. Karlson *et al.* (1993) reportaron que el etanol induce una isoenzima del citocromo P-450. No se detectaron ¹⁴CH₄ ni TBA.

En un estudio similar, Kane *et al.* (2001) investigaron si la adición de oxígeno promovería la biodegradación de MTBE en microcosmos de material acuífero y aguas subterráneas de cuatro diferentes sitios contaminados con MTBE limitados en oxígeno. En dos de los sitios hubo rápida biodegradación de MTBE (4.5 mg/L) en los 15 días posteriores a una fase lag de 4 días, pero hubo acumulación de TBA en uno de los sitios. En los sedimentos en los que hubo consumo de MTBE, entre 43 a 54% del ¹⁴C-MTBE añadido, se mineralizó a ¹⁴CO₂. No hubo degradación de MTBE en microcosmos de los dos sitios restantes después de 75 días.

Pruden *et al.* (2001) estudiaron la biodegradación de MTBE en cinco biorreactores aerobios de laboratorio inoculados con un licor mixto de desechos municipales, un licor mixto aclimatado a MTBE (Shell Development Co. proporcionado por J. Salanitro) y agua de lavado de material acuífero contaminado con MTBE, bajo cinco condiciones de sustrato: MTBE solo, MTBE y DEE, MTBE y DIPE, MTBE y etanol y MTBE y BTEX. Los cinco cultivos mostraron 99.9% de remoción del MTBE. La adición de sustratos alternativos no tuvo efecto en el desempeño de los reactores. Todos los cultivos fueron cultivos mixtos y cada enriquecimiento mostró tener una composición única.

Hatzinger *et al.* (2001) aislaron y describieron un organismo degradador de MTBE: *Hydrogenophaga flava* ENV735, el cual fue capaz de usar lentamente tanto MTBE como TBA como las únicas fuentes de carbono y energía. La adición de pequeñas cantidades de extracto de levadura potenció grandemente el crecimiento en estos sustratos. Basados en estudios de degradación con los inhibidores formaldehído, monóxido de carbono, alil tiourea, acetileno, 1-amino benzotriazol (ABT) y butadieno monoepóxido, encontraron que la degradación de MTBE y TBA estaba gobernada por dos diferentes enzimas. La degradación del MTBE fue inhibida por ABT, lo cual previamente se había visto como evidencia de actividad de citocromo P-450 mono-oxigenasa (Steffan *et al.* 1997). La

degradación del MTBE ocurrió sin fase lag, y esto sugiere que la degradación de MTBE ocurre constitutivamente. El TBA se acumuló durante la biodegradación del MTBE cuando creció en medio rico. La degradación de TBA podía ser inducida por TBA cuando el cultivo creció en TBA o MTBE, llevando a la conclusión de que la degradación de TBA fue inducible.

Deeb *et al.* (2001a) evaluaron las interacciones entre sustratos en mezclas de MTBE y BTEX durante su biotransformación aerobia por un cultivo puro de *R. gelatinosus* PM-1 capaz de utilizar el oxigenante para crecimiento. En cultivo líquido, las células crecidas en MTBE degradaron MTBE y benceno a velocidades máximas de 5.0 y 1.1 mg/L·h, respectivamente, aunque hubo una fase lag de 20 h antes de la degradación de benceno comenzara. Posteriormente al degradar una mezcla de MTBE + benceno o MTBE + tolueno, utilizando células crecidas en MTBE, se observó primero la degradación de MTBE, la degradación de los aromáticos se retrasó 4 h (una fase lag más corta que cuando el benceno estaba presente solo, sugiriendo que la presencia de MTBE realmente mejora la degradación de benceno). Después de la fase lag, los aromáticos fueron degradados rápidamente y la velocidad de biodegradación del MTBE fue significativamente más lenta. Los autores sugieren que la fase lag en la degradación del benceno y tolueno podía atribuirse a la inducción de las enzimas degradativas necesarias. Una vez que los aromáticos fueron degradados, la velocidad de degradación del MTBE se incrementó a su valor original. La presencia de etilbenceno o de xilenos en mezcla con MTBE, inhibió completamente la degradación de MTBE.

Wilson *et al.* (2001, 2002a) examinaron la degradación de MTBE como la única fuente de carbono y energía en un reactor de tanque agitado continuo (Continuous Stirred Tank Reactor CSTR) con retención de biomasa. El CSTR aerobio fue inoculado con un licor mixto de desechos municipales, un licor mixto aclimatado a MTBE (Shell Development Co. proporcionado por J. Salanitro), agua de drenado de un biofiltro alimentado con DEE y agua de lavado de material acuífero contaminado con MTBE. Un segundo CSTR sin inocular sirvió como un control abiótico. No hubo pérdida de MTBE en el CSTR control, demostrando que la remoción fue biológica. La remoción de MTBE fue completa cuando la concentración de sólidos volátiles suspendidos fue por arriba de 600 mg/L. Estudios por lotes confirmaron que la velocidad de degradación de TBA gobernó la velocidad global de reacción (velocidad de degradación de MTBE y TBA). La presencia de bajas concentraciones de TBA no afectó la velocidad de degradación de MTBE, pero altas concentraciones redujeron la velocidad de biodegradación del oxigenante.

Piveteau *et al.* (2001) determinaron que la cepa CIP I-2052 aislada de muestras de lodos activados podía degradar TBA como la única fuente de carbono y energía, pero no pudo degradar MTBE. La degradación de TBA fue estimulada por la adición de iones cobalto. Las máximas velocidades de crecimiento y de degradación de TBA fueron 0.032/h y 35.8 mg TBA/g peso seco·h respectivamente. El rendimiento fue de 0.54 g biomasa/g TBA. La cepa exhibió una particular especificidad hacia alcoholes: degradó TBA y TAA, pero no sus homólogos primarios y secundarios. Tampoco degradó etanol pero si compuestos de un carbono como metanol y formiato. No se detectó citocromo P-450 en este cultivo.

Kharoune *et al.* (2002) obtuvieron un consorcio microbiano de un suelo contaminado con gasolina capaz de degradar ETBE como única fuente de carbono y energía. Este consorcio también logró degradar MTBE, TAME y TBA como únicas fuentes de carbono y energía en cultivos por lotes sin una fase lag. No hubo acumulación de los alcoholes intermediarios TBA y TAA. La velocidad de degradación de MTBE fue de 1.1 mg/L·h cuando estaba solo o en combinación con ETBE, TAME y TBA. Cuando el TBA estuvo presente como el único sustrato, su velocidad de degradación fue mayor, 15 mg/L·h, pero decreció a 6.8 mg/L·h en la presencia de ETBE, MTBE y TAME. No se pudo determinar proteína debido a la formación de una película de biomasa en las paredes del recipiente.

Stringfellow & Oh (2002) realizaron estudios de laboratorio y de campo en biorreactores de lecho fluidizado para el tratamiento de MTBE. En uno de los biorreactores de campo, la biodegradación de MTBE nunca ocurrió, aunque en un segundo biorreactor la degradación espontánea de MTBE comenzó inmediatamente. Como resultado del desempeño desigual de los biorreactores de campo, se condujo una investigación en laboratorio para investigar si la adición de un cosustrato podía usarse para fomentar el enriquecimiento de poblaciones degradadoras de MTBE. El isopentano mostró ser el mejor cometabolito de los compuestos estudiados. El enriquecimiento del cultivo en isopentano resultó en la biotransformación de MTBE aún cuando la adición de isopentano fue descontinuada. Este resultado llevó a los investigadores a concluir que estos organismos son capaces de obtener energía de mantenimiento de la degradación de MTBE. El desempeño del reactor que transformó espontáneamente al MTBE fue igual al del reactor que tuvo isopentano como cosustrato.

François *et al.* (2002) aislaron una cepa metanótrofa de *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012, por enriquecimiento inicial de degradadores de TBA de una muestra de lodos activados. IFP 2012 degradó completamente 300 mg/L de MTBE como la única fuente de carbono y energía mineralizando el 68.7% después de 30 días de incubación. La velocidad específica de degradación de MTBE fue de 0.6 mmol/g peso seco·h, y el rendimiento fue 0.44 g peso seco/g MTBE. El organismo también fue capaz de degradar TAME, TBA, TAA, metanol y formiato como únicas fuentes de carbono y energía, sin embargo el ETBE sólo se degradó ligeramente. Las actividades de degradación de MTBE, TBA y ácido 2-hidroxiisobutírico (HIBA) se indujeron por MTBE y TBA, siendo éste último un buen inductor. Durante el crecimiento en MTBE, el TBA se acumuló inicialmente mientras que la concentración celular no cambió, una vez que el TBA fue degradado, se incrementó la densidad celular. Durante el crecimiento en MTBE se detectaron TBF e HIBA, además, el organismo creció en HIBA, 2-propanol, acetona, y metilacrilato, los cuales son posibles intermediarios del metabolismo del MTBE (Steffan *et al.* 1997). No se detectó citocromo P-450 en extractos celulares crudos. En estudios con inhibidores enzimáticos, se encontró que el metimazol, un inhibidor de monooxigenasas que contienen flavina, inhibió el crecimiento del organismo en TBA o HIBA y el acetileno inhibió el crecimiento en MTBE o TBA. La adición de iones cobalto eliminó la acumulación de HIBA en el medio de cultivo, el segundo punto más lento en la degradación de MTBE. Posteriormente, François *et al.* (2003) investigaron el efecto del TBF y el TBA en la degradación del MTBE usando células en reposo (resting cells). La adición de bajas concentraciones de TBF, disminuyeron la velocidad de degradación de MTBE en un 30%, en contraste, la adición de TBA no tuvo un efecto significativo en la degradación del MTBE, aún a concentraciones altas y se observó que la degradación de TBA solo ocurría una vez que se agotaba el MTBE. Se

identificó acetona como un intermediario de la degradación de TBA. La velocidad de degradación de TBF fue alrededor de cuatro veces más lenta que la del MTBE.

Una pregunta importante que involucra las mezclas contaminantes es si el MTBE inhibe la biodegradación de los otros contaminantes. Sedran *et al.* (2002) estudiaron el efecto de BTEX sobre la biodegradación de MTBE y TBA usando un cultivo mixto degradador de MTBE enriquecido en MTBE y BTEX. En estudios por lotes, la presencia de BTEX no tuvo un efecto significativo en la biodegradación de MTBE, pero afectó ligeramente la biodegradación de TBA. En la presencia de BTEX, la degradación de TBA mostró una fase lag, y su velocidad de degradación fue menor, aún después de que los BTEX no estuvieran ya presentes en el medio de cultivo. La velocidad de degradación del TBA fue significativamente más alta que la del MTBE en todos los niveles de concentraciones usadas. En otro estudio Pruden *et al.* (2001) no vieron impacto de mezclas de contaminantes sobre la biodegradación del MTBE por cinco cultivos enriquecidos en biorreactores de laboratorio. Los sustratos probados fueron MTBE solo y en combinación con BTEX, DEE, DIPE o etanol. Alrededor del 99.9% del MTBE fue biotransformado bajo todas las condiciones de sustrato. Vainberg *et al.* (2002) evaluaron la biodegradación de MTBE en un biorreactor de lecho fluidizado GAC a escala laboratorio. El reactor fue capaz de tratar MTBE a menos de 20 µg/L. La remoción del MTBE no fue afectada por la adición de TBA o BTEX bajo las condiciones evaluadas. Los componentes disueltos de la gasolina retardaron la biodegradación tanto de MTBE como de TBA en microcosmos de material acuífero de un sitio contaminado con MTBE (Kane *et al.* 2001); los microcosmos no estuvieron limitados por oxígeno. En la presencia de los componentes disueltos de la gasolina, se observó la acumulación de una alta concentración de TBA. En resumen, la gama de interacciones entre MTBE y BTEX (sus más comunes co-contaminantes) ha incluido la carencia de efecto en su degradación (Salanitro *et al.* 1996), aparente degradación simultánea (en biorreactores, Pruden *et al.* 2001; Vainberg *et al.* 2002), la utilización secuencial de ya sea MTBE o BTEX (dependiendo del sustrato de crecimiento de PM1, Deeb *et al.* 2001a), inhibición aparente de la degradación del MTBE (Deeb *et al.* 2001a), carencia de efecto sobre la degradación de MTBE aunque inhibición de la degradación de TBA (Sedran *et al.* 2002), reducción en la velocidad de degradación del MTBE (Kane *et al.* 2001) y el mejoramiento de la degradación (el caso del benceno en presencia de MTBE, Deeb *et al.* 2001a).

Schirmer *et al.* (2003) estudiaron la biodegradación de MTBE (2 mg/L) en microcosmos de material acuífero de la Base Borden de las Fuerzas Canadienses (Ontario, Canadá). Primero se examinó la habilidad para degradar MTBE bajo una variedad de condiciones (adicionado con NH₄, adicionado con CH₄, oxígeno disuelto (OD) bajo, bajo pH, bioaumentado con degradadores de pentano, controles inalterados y estériles) para simular las condiciones que un lodo de aguas subterráneas conteniendo MTBE puede haber experimentado durante su transporte a través del acuífero Borden. La degradación del MTBE solo se observó en los microcosmos inalterados. Más aún, el 50% de la transformación ocurrió en 68 días y no se observó transformación adicional en 267 días de incubación. No se detectaron TBA o TBF. En un segundo experimento se estudió el potencial de cometabolismo de MTBE usando los siguientes sustratos primarios: n-pentano, isopentano, hexano, ciclohexano, 3-metil pentano, tolueno, metano y metanol. La degradación de MTBE se observó con todos los sustratos primarios excepto para tolueno, metanol y metano. La desaparición de MTBE coincidió con la degradación del sustrato primario y cesó con su agotamiento.

Fisher *et al.* (2005) examinaron las transformaciones bióticas y abióticas del MTBE con respecto a las condiciones particulares de un sitio contaminado (una refinería en Leuna, Alemania). Muestras de agua subterránea de unos pozos del sitio contaminado, fueron usadas para experimentos aerobios y anaerobios en laboratorio. La concentración de benceno en las muestras de este pozo fue de 0.407 mg/L. Las concentraciones de los otros BTEX estuvieron por debajo del límite de detección. Bajo condiciones aerobias, la degradación inicial de MTBE fue lenta, aproximadamente 18% dentro de 18 días. Después de que el benceno se mineralizó, el MTBE se degradó rápidamente. En ningún caso se detectaron metabolitos, pero se detectó TBF, TBA y ácido fórmico en el sitio contaminado, posiblemente debido a las bajas temperaturas del agua subterránea. La degradación aerobia exitosa, parece tener lugar en ausencia de otros compuestos utilizables. Sin embargo el MTBE está a menudo acompañado por otros compuestos en sitios contaminados y prevalecen condiciones anaerobias. La hidrólisis del MTBE parece ser muy poco probable en el ambiente estudiado.

3.2.3 Degradación aerobia por cometabolismo

Se han identificado varios microorganismos aeróbicos, incluyendo bacterias y un hongo, capaces de degradar cometabólicamente al MTBE. También han sido identificados varios sustratos primarios que pueden ser usados para estimular la biodegradación del MTBE, incluyendo alcanos, aromáticos y compuestos cíclicos. En general, el cometabolismo del MTBE parece estar asociado más fuertemente con microorganismos que crecen aeróbicamente en alcanos de cadena corta (<C₈). Hyman (2000) propuso la hipótesis que la habilidad de los microorganismos para degradar cometabólicamente al MTBE es consistentemente encontrada en cepas que están predisuestas a catabolizar estructuras análogas del MTBE tales como un simple alcano ramificado y ya que los alcanos ramificados simples son componentes importantes de la gasolina y compuestos tales como el iso-pentano pueden representar arriba del 10% v/v de la gasolina fresca, la gasolina contiene muchos sustratos primarios importantes para los microorganismos que son capaces de oxidar cometabólicamente al MTBE.

Las investigaciones actuales indican que el paso inicial en el cometabolismo aeróbico del MTBE es catalizado por enzimas oxigenasas, específicamente un citocromo P-450 monooxigenasa. Mientras estudios de inhibición han soportado el papel de esta enzima en un sistema fúngico, es menos claro que esta enzima juegue un papel clave en sistemas bacterianos. Esta investigación es esencial para determinar el efecto potencial sobre la biodegradación del MTBE causada por la inhibición por otros sustratos.

El cometabolismo puede tener un papel en la atenuación natural, ya sea a través del uso de los alcanos presentes en la gasolina, o a través de la degradación de la materia orgánica natural en acuíferos (Borden *et al.* 1997, Schirmer *et al.* 2003). El cometabolismo también ha probado ser un buen modo de incrementar el rendimiento celular y de degradar MTBE, tanto *in situ* como en biorreactores.

Hardison *et al.* (1997) reportaron la habilidad de un hongo filamentoso, *Graphium* sp. ATCC 58400, de degradar DEE como la única fuente de carbono y energía pero no MTBE después de crecer en PDA. La producción de biomasa de *Graphium* se correlacionó con la

degradación de DEE. El MTBE solo o MTBE más butano se degradó cuando el micelio creció en propano o n-butano gaseoso, adherido a un soporte sólido (un filtro de fibra de vidrio). La velocidad inicial de degradación fue menor en presencia de n-butano (0.6 nmol/h-mg peso seco) que cuando se incubó en MTBE solo (1.9 nmol/h-mg). Sin embargo, con MTBE solo, la degradación de MTBE por *Graphium* terminó después de 18 h y continuó cuando se añadió n-butano. En experimentos de detección de intermediarios, TBF y TBA fueron productos detectados de la degradación de MTBE en fase gas. TBF fue producido primero y fue hidrolizado por un proceso químico y/o enzimático a TBA. En estos experimentos la máxima velocidad de degradación de MTBE fue de 4.5 nmol/h-mg peso seco. En cultivo líquido, solo se detectó TBA. La velocidad de consumo de MTBE en este caso alcanzó los 10.5 nmol/h-mg peso seco por una suspensión de micelio con n-butano. Los autores concluyeron que TBF es el metabolito primario, y que es hidrolizado a TBA en cultivo líquido. La acumulación extracelular de TBA dio cuenta de solo un máximo de 25% del MTBE total consumido. Los autores especulan que el hemiacetal tert-butoximetanol es formado por citocromo P-450 y entonces oxidado a TBF por una alcohol deshidrogenada. La degradación de MTBE fue inhibida por acetileno, etileno y todos los otros hidrocarburos insaturados que inhiben la actividad de oxidación de n-alcanos. Por lo tanto los autores creen que la biodegradación de MTBE (así como la degradación de DEE) ocurre a través de la acción de una enzima citocromo P-450. Los autores concluyen que la degradación de MTBE fue un proceso cometabólico que usó la misma enzima que oxida n-alcanos por cinco razones: (1) El MTBE comenzó a ser degradado inmediatamente después de que *Graphium* sp. crecido en n-butano se expuso a MTBE, (2) La degradación de MTBE fue inhibida por las mismas concentraciones de hidrocarburos insaturados que inhibieron la oxidación de n-alcanos, (3) los productos de la degradación del MTBE (TBF y TBA), se detectaron extra-celularmente, sugiriendo catabolismo incompleto y la inhabilidad de *Graphium* sp. de crecer en MTBE, (4) la degradación de MTBE por *Graphium* sp. incubado con n-butano y MTBE fue más lenta que la velocidad de degradación de MTBE solo, lo que sugiere una interacción competitiva entre n-butano y MTBE por la misma enzima, (5) para *Graphium* sp. incubado con MTBE solo, la degradación de MTBE declinó progresivamente y entonces fue estimulada por la adición de n-butano. Esta última observación sugiere que el poder reductor necesario para sostener la oxidación catalizada por citocromo P-450 fue agotado por MTBE y restaurado por la oxidación de butano.

Las bacterias propano-oxidantes producen una enzima monooxigenasa que puede oxidar varios sustratos, tales como propano, tricloroetano e hidrofluorocarbonos. La enzima incorpora un solo átomo de oxígeno en el sustrato. Steffan *et al.* (1997) investigaron si las bacterias propano-oxidantes podían también degradar cometabólicamente al MTBE, TAME y ETBE. Ellos usaron una cepa de colección, tres aislados naturales y un cultivo mixto de un biorreactor de escala de campo. Tanto la cepa de colección como los aislados naturales degradaron cada compuesto después de crecer en propano. Un aislado, la cepa ENV425, degradó ^{14}C -MTBE (20 mg/L) sin una fase lag convirtiendo más del 60% del MTBE añadido a $^{14}\text{CO}_2$ en menos de 30 h. La oxidación inicial de MTBE y ETBE resultó en la producción casi estequiométrica de TBA, mientras que la oxidación de TAME resultó en la producción de TAA. El grupo metil metoxi del MTBE fue oxidado a formaldehído y luego a CO_2 . La degradación de TBA no ocurrió hasta que el MTBE fue completamente removido de los reactores y se oxidó a 2-metil-2-hidroxi-1-propanol (también conocido

como 2-metil-1,2-propanodiol: MHP) primero y luego a HIBA. Ninguno de estos productos sirvió como sustrato de crecimiento para los propano-oxidantes. Las velocidades de degradación de la cepa ENV421 estuvieron en el rango de 2.1 a 9.2 nmol/min-mg prot (a 13 y 28 °C respectivamente), mientras que para la cepa ENV425 fueron de 0.71-4.6 nmol/min-mg prot a las mismas temperaturas. Para el TBA con la cepa ENV421 fueron de 1.3 a 2.4 nmol/min-mg prot y para ENV425 de 0.53 a 1.6 nmol/min-mg prot, explicando porque el TBA fue detectado como un intermediario. El HIBA se acumuló durante la degradación, sugiriendo que su catabolismo es el paso limitante de la reacción en la degradación del MTBE. Análisis de extractos celulares de ENV425 y experimentos con inhibidores enzimáticos implicaron una enzima P-450 soluble en la oxidación tanto de MTBE y de TBA.

Hyman *et al.* (1998) mostraron que una cepa de *Mycobacterium vaccae* y una de *Xanthobacter* son capaces de degradar MTBE cometabólicamente usando alcanos e isoalcanos de gasolina tales como isopentano como sustratos de crecimiento. La oxidación de MTBE por *Xanthobacter* y *Mycobacterium vaccae* crecidas en propano fue inhibida por acetileno pero no por etileno, aportando evidencia de que la oxidación inicial no es catalizada por un citocromo P-450, en su lugar, la enzima es una oxigenasa no-hemo. Parece nuevamente que TBF es formado antes que TBA. Del mismo modo, el TBA parece ser degradado por la misma enzima que oxida propano y MTBE. Los autores también probaron una variedad de otros hidrocarburos, muchos de los cuales son componentes de la gasolina, por su habilidad para promover la degradación de MTBE. Los alcanos n-butano, n-pentano, n-hexano, isobutano e isopentano podían también servir como co-sustrato para potenciar la degradación de MTBE. En estudios posteriores, se reportaron las habilidades de cepas de *Xanthobacter*, *Alcaligenes eutrophus* y *Mycobacterium vaccae* para cometabolizar MTBE siguiendo al crecimiento en alcanos simples de cadena lineal o ramificados, (Hyman & O'Reilly 1999). Las velocidades de oxidación de MTBE estuvieron en el rango de 5.9 a 15 nmol MTBE/mg prot·min dependiendo del sustrato de crecimiento y del cultivo. Con los tres cultivos, TBF y TBA fueron los productos de degradación principales. TBA se degradó posteriormente, si bien lentamente, por las cepas de *Xanthobacter* (3.1 nmol TBA/g prot·min).

Garnier *et al.* (1999) aisló una *Pseudomonas aeruginosa* de un suelo contaminado por gasolina, enriquecido en pentano que degradó MTBE. El aislado fue crecido en cultivo líquido con pentano como una fuente de carbono y energía. Este aislado degradó MTBE solo en la presencia de pentano. La máxima velocidad de degradación fue reportada como 3.9 nmol/min-mg de proteína. La velocidad de crecimiento del aislado en pentano fue menor en presencia de MTBE. La constante de saturación K_s , para pentano y MTBE fueron determinadas en 2.9 µg/L y 185 mg/L, respectivamente. Cowan & Park (1996) reportaron un K_s de 12.0 mg/L para MTBE para un cultivo mixto crecido en MTBE como la única fuente de carbono.

Posteriormente, Dupasquier *et al.* (2002) llevaron a cabo estudios de degradación de vapores de MTBE por cometabolismo con pentano usando la cepa de *P. aeruginosa* CDBB-1230 aislada por Garnier *et al.* (1999). Los experimentos se realizaron en un biofiltro de 2.4 litros empacado con vermiculita. Sus resultados comprueban la degradación

cometabólica del MTBE en presencia de pentano observada por Garnier. La capacidad de eliminación (EC) del pentano fue de $12 \text{ g/m}^3 \cdot \text{h}$ a un tiempo de residencia de 1.1 horas y una concentración de entrada de 18.6 g/m^3 , mientras que para el MTBE la EC fue entre 0.3 y $1.8 \text{ g/m}^3 \cdot \text{h}$ a concentraciones de entrada entre 1.1 y 12.3 g/m^3 . Para ambos productos, encontraron una relación lineal entre la concentración y la altura del biofiltro y concluyen que esta conducta indica que las velocidades de degradación de MTBE y pentano estuvieron limitadas por la reacción biológica. El modelo matemático que utilizaron, predijo satisfactoriamente los perfiles de concentración de pentano y MTBE con la altura del biofiltro. Por otra parte, se observó que la eficiencia de remoción del pentano decrece con incrementos en la concentración de entrada de MTBE y explican este fenómeno como una inhibición de la degradación de pentano por MTBE.

Garnier *et al.* (2000) estudiaron el cometabolismo de MTBE con 1) gasolina, 2) compuestos que se encuentran en la gasolina: aromáticos (benceno, xileno y tolueno), alcanos cíclicos (ciclohexano), n-alcanos (pentano, hexano, heptano), y 3) compuestos que tienen alguna semejanza estructural con la molécula de MTBE: DEE, TBA, isopropanol, 2,2-dimetil butano (2,2-DMB) y 2,2,4-trimetil pentano (2,2,4-TMP). Para estos estudios se emplearon consorcios aislados de muestras de suelos contaminados con gasolina. Sus resultados muestran que la gasolina con aproximadamente 10% de MTBE (mezcla comercial) se mineralizó en un 97% en 6 días. No se observó degradación del MTBE con los compuestos aromáticos ni con ciclohexano. En las mezclas con los n-alcanos, el MTBE se cometabolizó con pentano ($200 \mu\text{g/día}$), con hexano ($42 \mu\text{g/día}$) y con heptano ($87 \mu\text{g/día}$). Los n-alcanos se mineralizaron en un 100%. Se encontró además cometabolismo de MTBE ($83 \mu\text{g/día}$) con DEE (85% en 17 días). Con TBA no se pudo determinar si hubo degradación. No se mineralizaron 2,2-DMB y 2,2,4-TMP ni tampoco el MTBE. El alcohol isopropílico se mineralizó en un 100% pero el MTBE prácticamente no se degradó.

Koenigsberg *et al.* (1999) reportaron el cometabolismo de MTBE con un cultivo crecido en benceno designado PEL-B201. PEL-B201 degradó aproximadamente 3.4 mg/L de MTBE en 12 horas después de haber crecido en benceno. La presencia de benceno inhibió severamente la degradación de MTBE a concentraciones tan bajas como 0.15 mg/L presumiblemente debido a inhibición competitiva. En la presencia de 0.3 mg/L de benceno, el tiempo requerido para degradar 3.4 mg/L de MTBE se incrementó de 12 a 50 horas. Conforme se incrementaban las concentraciones de MTBE, se inhibió la degradación de benceno.

Hernández-Pérez *et al.* (2001) seleccionaron una cepa de *Rhodococcus ruber* (antes *Gordonia terrae*) IFP 2001 de lodos activados por su capacidad para crecer en ETBE como única fuente de carbono y energía. También seleccionaron una cepa de *Gordonia terrae* IFP 2007 derivada de la cepa IFP 2001. Ninguna de las dos cepas fue capaz de degradar MTBE o TAME como únicas fuentes de carbono y energía, pero estos compuestos fueron transformados cometabólicamente a sus respectivos alcoholes, TBA y TAA, si las dos cepas habían crecido en una fuente de carbono tal como etanol. ETBE fue transformado a TBA. No se observaron compuestos de dos carbonos durante el crecimiento en ETBE, pero se produjo formiato durante la degradación cometabólica de MTBE o TAME. Los alcoholes se acumularon en todos los casos en cantidades estequiométricas. Los

investigadores, basados en un pico observado cerca de 447 nm en un espectro de absorción diferencial de extractos libres de células de células inducidas y no inducidas, implicaron un citocromo P-450 en la degradación.

Liu *et al.* (2001) reportaron un *Arthrobacter* (ATCC 27778) capaz de degradar cometabólicamente bajas concentraciones de MTBE cuando creció en butano. El cultivo degradó concentraciones de MTBE en un rango de 100 a 800 µg/L, con una concentración de saturación media aparente (K_s) de 2.14 mg/L y una velocidad máxima de utilización de sustrato (de 0.43 mg/mg de sólidos suspendidos por día). El TBA se produjo concomitantemente y se acumuló a una velocidad más baja. El *Arthrobacter* no cometabolizó MTBE cuando creció en butanol, glucosa o caldo triptosa fosfato. En experimentos con MTBE uniformemente marcado, 30% fue recuperado como $^{14}\text{CO}_2$ y el remanente 70% se encontró en productos radiomarcados; no hubo productos radiomarcados en las células. El *Arthrobacter* crecido en butano, también fue capaz de degradar TBA. Si se añadía butano a la incubación en MTBE, la degradación se limitaba al 15%. El acetileno limitó la biodegradación tanto de MTBE como de TBA, implicando el involucramiento de una misma enzima. En ensayos del efecto del TBA sobre la degradación de MTBE, incrementos en la concentración de TBA inhibieron la degradación de MTBE, proporcionando soporte adicional a la conjetura de que una misma enzima es responsable tanto de la degradación de MTBE como de TBA en *Arthrobacter* (ATCC 27778). Experimentos posteriores indicaron que la degradación de MTBE estuvo limitada ya sea por un metabolito tóxico o por la carencia de poder reductor.

Schirmer *et al.* (2003) investigaron la biodegradación de MTBE en microcosmos de material acuífero de la Base Borden (Ontario, Canadá). Se estudió el potencial de cometabolismo de MTBE usando los siguientes sustratos primarios: n-pentano, isopentano, hexano, ciclohexano, 3-metil pentano, tolueno, metano y metanol. La degradación de MTBE se observó con todos los sustratos primarios excepto para tolueno, metanol y metano. La desaparición de MTBE coincidió con la degradación del sustrato primario y cesó con su agotamiento.

Smith *et al.* (2003a) caracterizaron las reacciones iniciales en la oxidación cometabólica de MTBE por *Mycobacterium vaccae* JOB5. Cuando las células crecidas en propano se incubaron en MTBE se observó la rápida acumulación extracelular de dos productos: TBF y TBA. También se observó la producción de estos compuestos aunque a velocidades menores cuando las células crecieron en 1- o 2-propanol. No se observó la generación de estos productos con células crecidas en caldo de caseína-extracto de levadura-dextrosa. Estudios cinéticos con células crecidas en propano demostraron que TBF es el producto inicial dominante (>80%) de la oxidación de MTBE y que el TBA se acumula por la hidrólisis posterior biótica o abiótica del TBF. Sus resultados sugieren que la hidrólisis biótica del TBF es catalizada por una esterasa termoestable con actividad hacia varios otros tert-butil ésteres. Las células crecidas en propano también oxidaron TBA, pero no se detectaron productos posteriores de la oxidación. Al igual que la oxidación del MTBE, la oxidación del TBA fue completamente inhibida por acetileno, un inactivador de cadena corta de alcano-monooxigenasas en *M. vaccae* JOB5. La oxidación tanto de MTBE y TBA también fue inhibida por propano ($K_i = 3.3$ a 4.4 µM). Se derivaron valores para MTBE y

TBA de K_s de 1.36 y 1.18 mM, respectivamente, y de $V_{m\acute{a}x}$ de 24.4 y 10.4 nmol/min-mg de proteína. Los investigadores concluyeron que los pasos iniciales en la ruta de oxidación de MTBE por *M. vaccae* JOB5 involucra dos reacciones catalizadas por la misma monooxigenasa (oxidación de MTBE y TBA) que están temporalmente separadas por la hidrólisis de TBF a TBA catalizada por una esterasa. Estos resultados sugieren que las reacciones iniciales de la oxidación del MTBE por *M. vaccae* JOB5 son las mismas que aquellas que previamente habían caracterizado en un hongo que utilizó alcanos gaseosos.

En un trabajo posterior Smith *et al.* (2003b) investigaron el cometabolismo del MTBE por una cepa de *Pseudomonas mendocina* KR-1 que crecía en tolueno, n-alcanos (C_5 a C_8), y alcoholes primarios (C_2 a C_8), pero no en otros aromáticos, n-alcanos gaseosos (C_1 a C_4), isoalcanos (C_4 a C_6), alcoholes secundarios (C_3 a C_8), MTBE, o TBA. Las células crecidas bajo condiciones limitadas de carbono en n-alcanos en la presencia de MTBE (42 μ mol) oxidaron alrededor del 94% del MTBE a TBA. Cuando las células crecieron ya sea en alcoholes primarios, tolueno o dextrosa en presencia de MTBE, menos del 3% del MTBE añadido se oxidó a TBA. Células crecidas en n-pentano oxidaron MTBE a TBA sin una fase lag y sin generar TBF como un intermediario. Este último cultivo no consumió TBF ni TBA, mientras que formaldehído, el producto C1 esperado de la dealquilación del MTBE se consumió rápidamente. Se observaron valores similares de K_s para MTBE por células crecidas en n-alcanos de C_5 a C_8 (12.95 ± 2.04 mM), sugiriendo que la misma enzima oxida MTBE en las células crecidas en cada n-alcano. Todos los n-alcanos que soportaron el crecimiento (C_5 a C_8) inhibieron la oxidación del MTBE por células en reposo (resting cells) crecidas en pentano. El propano ($K_i = 53$ μ M) y n-butano ($K_i = 16$ μ M) también inhibieron la oxidación del MTBE y ambos gases fueron consumidos durante el crecimiento en n-pentano. Se ha reportado que el sistema enzimático de alcano hidroxilasa en *Pseudomonas oleovorans* GPo1 no es reactivo hacia el MTBE (Steffan *et al.* 1997). En otro trabajo, Smith & Hyman (2004) reexaminaron este hallazgo al usar células de la cepa GPo1 crecidas en un medio rico conteniendo diciticlopropilcetona (DCPK), un potente inductor de la actividad de alcano hidroxilasa. Las células crecidas con DCPK oxidaron MTBE y generaron cantidades estequiométricas de TBA. También oxidaron TAME, pero no TBA, ETBE o TAA. Los autores no encontraron producción de TBA a partir de MTBE con células de la cepa GPo1 crecida en medio rico sin DCPK. Tampoco se observó producción de TBA por células de GPo12, una cepa que carece del plásmido OCT que codifica para la alcano hidroxilasa. Se observó que todos los n-alcanos que soportan el crecimiento de la cepa GPo1, inhibieron la oxidación de MTBE por células tratadas por DCPK.

Johnson *et al.* (2004) observaron que células de *Mycobacterium vaccae* JOB5 crecidas en alcanos, degradan cometabólicamente MTBE a través de las actividades de una alcano-monooxigenasa inducible y otras enzimas en la ruta de oxidación de alcanos. Los autores examinaron el efecto del MTBE sobre la actividad de oxidación de MTBE por cultivos de *M. vaccae* JOB5 crecidos en diversos sustratos no alcanos. Se cultivaron células limitadas en carbono en glicerol, lactato, varios azúcares e intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos, tanto en presencia o ausencia de MTBE. En todos los cultivos que contenían MTBE, se observó el consumo de MTBE con acumulación de TBA y TBF en el medio de cultivo. El acetileno inhibió completamente el consumo de MTBE y la

acumulación de productos, pero no tuvo otros efectos aparentes en el cultivo. La estimulación de la oxidación de MTBE por el propio oxigenante en células crecidas en fructosa y glicerol fue saturable con respecto a la concentración de MTBE ($K_s = 2.4$ a 2.75 mM). TBA y TAME también indujeron la actividad enzimática requerida para su propia degradación en células crecidas en glicerol. La presencia de MTBE también promovió su oxidación en ácidos orgánicos, compuestos que a menudo son encontrados en ambientes anaeróbicos contaminados con gasolina.

Morales *et al.* (2004) obtuvieron dos consorcios microbianos denominados M1 y M2 correspondientes a muestras de suelos de sitios biorremediados y contaminados con gasolina respectivamente que enriquecieron con pentano, hexano, isooctano y tolueno. Los investigadores observaron cometabolismo de MTBE con estos sustratos excepto con tolueno, a velocidades máximas de degradación de 49, 12 y 32 mg/g proteína·h respectivamente. En experimentos con pentano con los consorcios M1 y M2 se observó una conducta interesante: aún cuando el pentano se agotó en aproximadamente 48 h, el MTBE se consumió completamente después de un largo periodo. En este caso, TBA también estuvo presente como intermediario, pero fue posteriormente degradado. Los valores del coeficiente cometabólico logrado con M1 y M2 fueron de 1 y 0.9 mg MTBE/mg pentano. El análisis de 16S rDNA de los microorganismos aislados del consorcio adaptado en pentano, mostraron que podían ser asignados a *Pseudomonas*.

3.2.4 Degradación anaerobia

A la fecha hay pocos reportes de degradación exitosa de MTBE bajo condiciones anaerobias, pero ésta es un área activa de investigación. El potencial para la biodegradación anaeróbica del MTBE es esencialmente importante a la luz del papel de la atenuación natural como método de remediación para la contaminación con gasolina disuelta. Debido a que el corazón o áreas fuente de plumas de BTEX es anaerobio, es importante saber cual es el destino del MTBE bajo estas circunstancias. Hay reportes mixtos de biodegradación anaeróbica de MTBE; algunos han sido negativos (por ejemplo, Suflita & Mormile 1993, Mormile *et al.* 1994, Landmeyer *et al.* 1998, Bradley *et al.* 1999) y otros positivos (Bradley *et al.* 2001a, 2001b, Finneran & Lovley 2001, Somsamak *et al.* 2001, Kolhatkar *et al.* 2002).

Suflita & Mormile (1993) condujeron la primera investigación en materia de biodegradación anaerobia de oxigenantes de gasolina. Ellos usaron lodos acuíferos para probar como sustratos varios alcoholes de cadena lineal y ramificados, cetonas, esterres y éteres a concentraciones de 50 mg C/L. La degradación anaeróbica se monitoreó por la desaparición de los compuestos y la formación de metano. Los alcoholes de cadena lineal metanol, etanol y propanol fueron fácilmente degradados a las cantidades teóricamente esperadas de metano con periodos lag de 5 a 30 días y velocidades de degradación de 7 a 19 mg C/L día. El alcohol ramificado TBA no se degradó después de 252 días de incubación. Las cetonas de cadena lineal metil etil cetona y acetona fueron fácilmente degradadas (7 a 9 mg C/L·d) pero la cetona ramificada metil isobutil cetona sólo se degradó ligeramente (0.9 mg C/L·d) y tuvo un periodo de aclimatación mayor. Los ésteres se degradaron fácilmente a metano. La mayoría de los éteres probados fueron recalcitrantes bajo condiciones

metanogénicas. Solamente el metil butil éter fue ligeramente degradado (0.5 mg C/L.d) después de 84 días de aclimatación. En general, la estructura química fue el factor más importante para determinar su biodegradabilidad bajo condiciones metanogénicas.

Yeh & Novak (1994) estudiaron la biodegradación de MTBE, ETBE y TBA en microcosmos de suelo bajo condiciones metanogénicas, sulfato-reductoras y desnitrificantes. Los suelos no tenían historial de contaminación por combustibles. Se adicionaron éteres o TBA (100 mg/L) y nitrato (5 mM), sulfato (2 mM) o cisteína + Na₂S (para promover metanogénesis para estudiar diferentes procesos anaerobios. Después de 250 días de incubación a 20 °C, no se observó degradación de MTBE en los microcosmos sin adiciones. El ETBE fue degradado solamente en dos de las muestras de suelo y el TBA fue el compuesto más fácil de degradar. El MTBE fue el compuesto más persistente bajo las condiciones estudiadas. El ETBE fue degradado en solo dos de los suelos bajo condiciones desnitrificantes. El MTBE se degradó bajo condiciones metanogénicas después de 270 días de incubación. En general, el MTBE y el ETBE se degradaron en suelos con el menor contenido en materia orgánica y a pH alrededor de 5.5.

Mormile *et al.* (1994) probaron la susceptibilidad a la degradación anaerobia de una serie de alcoholes, cetonas, ésteres y éteres oxigenados en muestras de cuatro ambientes sedimentarios crónicamente contaminados. También se evaluó el efecto de varios aceptores de electrones en la biodegradación de los oxigenantes con una sola fuente de inóculo. Los autores reportaron la conversión metanogénica de MTBE a TBA después de 152 días de aclimatación en una sola réplica de un sedimento de río crónicamente contaminado con combustible. La susceptibilidad de decaimiento anaerobio de los oxigenantes estudiados se pudo relacionar con su estructura química: no se encontró evidencia de la biodegradación anaeróbica de MTBE en un gran número de las otras muestras mantenidas bajo condiciones metanogénicas, sulfato-reductoras o nitrato-reductoras; metil butil éter sin embargo, fue fácilmente degradado bajo condiciones metanogénicas y sulfato-reductoras.

Bradley *et al.* (1999) estudiaron la degradación de ¹⁴C-MTBE uniformemente marcado en microcosmos de lechos sedimentarios contaminados con gasolina bajo estrictas condiciones anaeróbicas. No hubo mineralización significativa de MTBE bajo estas condiciones, pero los microcosmos produjeron metano.

Kropp *et al.* (2000) condujeron un estudio similar en el cual se investigaron lodos sedimentarios para la biodegradación anaerobia de MTBE y otros oxigenantes de gasolina alternativos, tales como metanol, etanol e isopropanol así como otros de los éteres empleados tales como TAME, ETBE y DIPE. Ellos encontraron que los alcoholes simples fueron susceptibles de biodegradación anaeróbica, pero el efecto de incrementar las ramificaciones, como es visto en el TBA, incrementó la persistencia al decaimiento anaeróbico. Esta misma observación (que el incremento en la ramificación tiende a incrementar la persistencia al decaimiento anaerobio) fue también vista con el MTBE y su isómero butil metil éter. En general, mientras se encontró evidencia definitiva para la biodegradación anaerobia del MTBE y otros éteres oxigenantes bajo condiciones metanogénicas, el fenómeno no fue generalizado. Los investigadores concluyeron que el MTBE debería ser considerado como un compuesto para el cual la biodegradación anaeróbica es extremadamente difícil.

U.S. EPA (2000) condujeron estudios de microcosmos de laboratorio en soporte de un estudio de campo para determinar si MTBE podría ser degradado bajo condiciones metanogénicas en agua subterránea contaminada por un derrame de combustible. Los microcosmos se prepararon de material acuífero y agua subterránea estéril y adicionaron con MTBE o MTBE y alquilbencenos. Se prepararon controles abióticos para cada tratamiento con material acuífero estéril. Las concentraciones iniciales de MTBE en los cuatro juegos de microcosmos (dos tratamientos, vivos y estériles) estuvieron en el rango de 2980 µg/L a 5680 µg/L. En el tratamiento de MTBE + alquilbencenos, la concentración de MTBE declinó en los microcosmos vivos (decreció en promedio de 5680 µg/L a 81 µg/L) y en los microcosmos control (decreció de un promedio de 3330 µg/L a 1466 µg/L) en 490 días de incubación. El MTBE no se degradó hasta que los alquilbencenos fueron completamente removidos. En el tratamiento con MTBE solo, el oxigenante se degradó (3112 µg/L a < 40 µg/L) en 490 días. Los microcosmos control decrecieron de 2908 µg/L a 1571 µg/L. Los autores no determinaron si el decremento en los controles fue debido a la sorción al material acuífero o a pérdidas por volatilización, aunque hubo pérdidas significativas abióticas de los alquilbencenos.

Investigaciones más recientes han estudiado la degradación anaeróbica de MTBE y TBA en sedimentos de un acuífero contaminado con petróleo (Finneran & Lovley, 2001). En los microcosmos de sedimentos se adicionaron 50 mg/L de MTBE y TBA. En algunos casos también se adicionó óxido férrico (sin quelar), Fe(III) quelado, antraquinona-2,6-disulfonato (AQDS, un análogo de sustancias húmicas) y ácidos húmicos. No se observó degradación de MTBE en los microcosmos sin adición o en los microcosmos adicionados con Fe(III) quelado o sin quelar después de 257 días de incubación. Una de las réplicas de óxido férrico + sustancias húmicas mostró pérdidas de MTBE, y cuando el MTBE fue restituido, éste fue degradado sin fase lag. En los microcosmos con AQDS, hubo 60% de degradación del MTBE. Los autores especularon que la degradación del MTBE ocurrió en microcosmos conteniendo óxido férrico como un aceptor de electrones más sustancias húmicas debido a que los microorganismos que reducen Fe(III) oxidan MTBE y transfieren los electrones hacia las sustancias húmicas. Las sustancias húmicas reducidas entonces transfieren abióticamente electrones al Fe(III), regenerando la forma oxidada de las sustancias húmicas. De este modo, la materia húmica sirve como un transportador de electrones, permitiendo la reducción continua del Fe(III). Los investigadores han demostrado previamente que las sustancias húmicas sirven como un transportador de electrones hacia óxidos de Fe(III) (Lovley *et al.* 1996).

Somsamak *et al.* (2001) estudiaron la biotransformación anaerobia de MTBE, ETBE y TAME bajo diferentes condiciones anóxicas de aceptores de electrones, para lo cual establecieron enriquecimientos de un inóculo proveniente de sedimentos de un estuario contaminado bajo condiciones que promovieran la desnitrificación, sulfato reducción, reducción de Fe(III) o metanogénesis. Se encontró que el MTBE y el TAME se transformaron completamente bajo condiciones sulfato-reductoras, concomitantes con la reducción del sulfato. Como consecuencia se acumularon TBA y TAA en el medio de cultivo después de 126 días en cantidades estequiométricas. La cantidad de sulfato consumida correspondió a la cantidad requerida para oxidar el grupo metil metoxi ya sea de MTBE o TAME a CO₂. No se observó la transformación de MTBE y TAME bajo las otras

condiciones de aceptores de electrones en 3 años. No hubo pérdidas bióticas de ETBE bajo ninguna de las condiciones probadas.

3.2.5 Biorremediación

Muchas de las tecnologías convencionales (SVE, MPE, Aspersión de aire, arrastre con aire, bombeo y tratamiento, etc.) usadas para remediación de sitios contaminados con gasolina, han mostrado ser poco efectivas en la remoción del MTBE del suelo y agua subterránea, por sus bajas eficiencias y altos costos. En adición a las tecnologías convencionales, varias tecnologías emergentes *in situ* y *ex situ* han mostrado gran expectación en estudios de campo para la remoción de MTBE de medios contaminados. Las tecnologías prometedoras *in situ* incluyen oxidación química (Leethem 2001), bioestimulación/bioaugmentación (Salanitro *et al.* 2000, Wilson *et al.* 2002b) y fitorremediación (Zhang *et al.* 2001) mientras que las tecnologías *ex situ* incluyen la sorción en resinas sintéticas (Annesini *et al.* 2000), procesos avanzados de oxidación (Stefan *et al.* 2000, Safarzadeh-Amiri 2001) y tratamientos biológicos (Yeh & Novak 1995, Fortin & Deshusses 1999a, b, Acuña- Askar *et al.* 2000, Deeb *et al.* 2001a, 2001b, Salanitro *et al.* 2000, Stocking *et al.* 2000, U.S. EPA 2000, Bradley *et al.* 2001a, 2001b, Finneran & Lovley 2001, Hatzinger *et al.* 2001, Landmeyer *et al.* 2001, Dupasquier *et al.* 2002). Otras tecnologías prometedoras *ex situ* que aún no han sido probadas a nivel de campo incluyen el uso de membranas o la extracción con solventes para la remoción de MTBE de aguas subterráneas (Keller & Bierwagen 2001, Vane *et al.* 2001). La presencia de TBA en aguas subterráneas es de preocupación debido a la efectividad y al costo del tratamiento de aguas. Esto es debido principalmente al hecho que el TBA es altamente polar, es débilmente sorbido en carbón activado y no puede ser removido del agua por tecnologías convencionales. Sin embargo el TBA puede ser removido del agua en carbón activado granular y otros sistemas como resultado de la biodegradación. Algunas investigaciones recientes de campo han indicado que la biodegradación del MTBE en el ambiente puede ocurrir naturalmente. En algunos casos, la adición de oxígeno a ambientes anóxicos lleva a un incremento en la velocidad de biodegradación de MTBE en aguas subterráneas. (Salanitro *et al.* 2000, Wilson *et al.* 2002b). Sin embargo la presencia de compuestos aromáticos de la gasolina disminuyen en algunos casos la velocidad de degradación de MTBE (Deeb *et al.*, 2001a), sugiriendo que el MTBE puede ser más efectivamente degradado después de que ha migrado más allá de los constituyentes de la gasolina en aguas subterráneas. En adición a la presencia de oxígeno, la atenuación natural en una liberación de MTBE podría ser potencialmente mejorada si la población microbiana indígena hubiera tenido exposición previa al MTBE y hubiera por lo tanto desarrollado los mecanismos para degradarlo. Las condiciones geoquímicas en la zona saturada, incluyendo la presencia de aceptores de electrones y nutrientes, así como un pH favorable, también juegan un papel importante para determinar la atenuación natural exitosa (Bradley *et al.*, 2001a, 2001b).

3.2.6 Ruta de degradación

Aunque se ha reportado que varios cultivos puros y mixtos degradan MTBE, la ruta(s) responsable(s) para su degradación no ha sido completamente dilucidada. Resultados de varios de los estudios arriba discutidos sugieren que el enlace éter del MTBE es

enzimáticamente roto produciendo TBA y formaldehído como los intermediarios metabólicos predominantemente detectables. Para el dimetil éter, el mecanismo degradativo propuesto es que una monooxigenasa inserta un átomo de oxígeno para producir un hemiacetal, metoxi metanol. Este compuesto es inestable y dismuta en el alcohol y aldehído. La enzima no cataliza el rompimiento real del enlace éter, pero hace al éter más reactivo por cambiar su estructura a otra (el hemiacetal) que se dividirá espontáneamente. Steffan *et al.* (1997) propusieron una ruta muy similar para la degradación del MTBE por un organismo propano-oxidante, la cepa bacteriana ENV425. Este hemiacetal dismutaría a TBA y formaldehído. En su ruta, el TBA sería entonces oxidado a 2-metil-2-hidroxi-1-propanol (MHP) y posteriormente oxidado a ácido 2-hidroxiisobutírico (HIBA). La degradación del HIBA parece ser el paso limitante de la reacción.

Algunos estudios sin embargo sugieren que *tert*-butil formiato (TBF) es el primer metabolito de la degradación de MTBE (Hardison *et al.* 1997, Hyman *et al.* 1998) y que debido a su rápida velocidad de hidrólisis, éste es rápidamente convertido a TBA el cual en ocasiones se acumula permanente o transitoriamente a niveles detectables (Church *et al.* 1999, François *et al.* 2002). Se especula que los intermediarios posteriores incluyen 2-propanol, acetona e hidroxiacetona. (Church *et al.* 2000, Deeb *et al.* 2000b, Salanitro *et al.* 1998, Steffan *et al.* 1997).

Deeb *et al.* (2000a) mostraron que el TBF, el TBA, el HIBA, hidroxiacetona y formaldehído, (intermediarios conocidos de la degradación de MTBE), produjeron consumo (disponibilidad) de oxígeno en células de *Rubrivivax gelatinosus* PM1, sugiriendo que son intermediarios en el metabolismo de MTBE por este microorganismo. La acetona, el MHP y el ácido fórmico no actuaron de este modo.

En la Figura 3.1 se muestran las rutas metabólicas propuestas para la biodegradación aerobia de MTBE. De los mecanismos mencionados en la sección 3.2.1 para el rompimiento biótico del enlace éter, el rompimiento oxigenativo por enzimas monooxigenasas y la oxidación por citocromos P-450, son los más directamente aplicables a la degradación del MTBE. Estas enzimas insertan un átomo de oxígeno en el sustrato y reducen el otro a agua. Las enzimas citocromo P-450 son comunes tanto a células procariontes como a eucariontes y han probado ser responsables de la transformación de MTBE a TBA en tejidos de rata y ratón y en microsomas de hígado humano (Hong *et al.* 1997). Tanto la oxidación por monooxigenasas no hémicas como por citocromos P-450 han sido postulados en la biodegradación microbiana de oxigenantes; por ejemplo, Hyman *et al.* (1998) observaron que para *Xanthobacter*, una monooxigenasa no asociada con citocromo P-450 fue responsable por la oxidación de MTBE a MHP. François *et al.* (2002) tienen evidencia de actividad monooxigenasa (posiblemente no hémica) en *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012, Hardison *et al.* (1997) encontraron actividad de citocromo P-450 en *Graphium* sp. Steffan *et al.* (1997) observó que una monooxigenasa P-450 estuvo involucrada con la oxidación del MTBE por microorganismos propano-oxidantes.

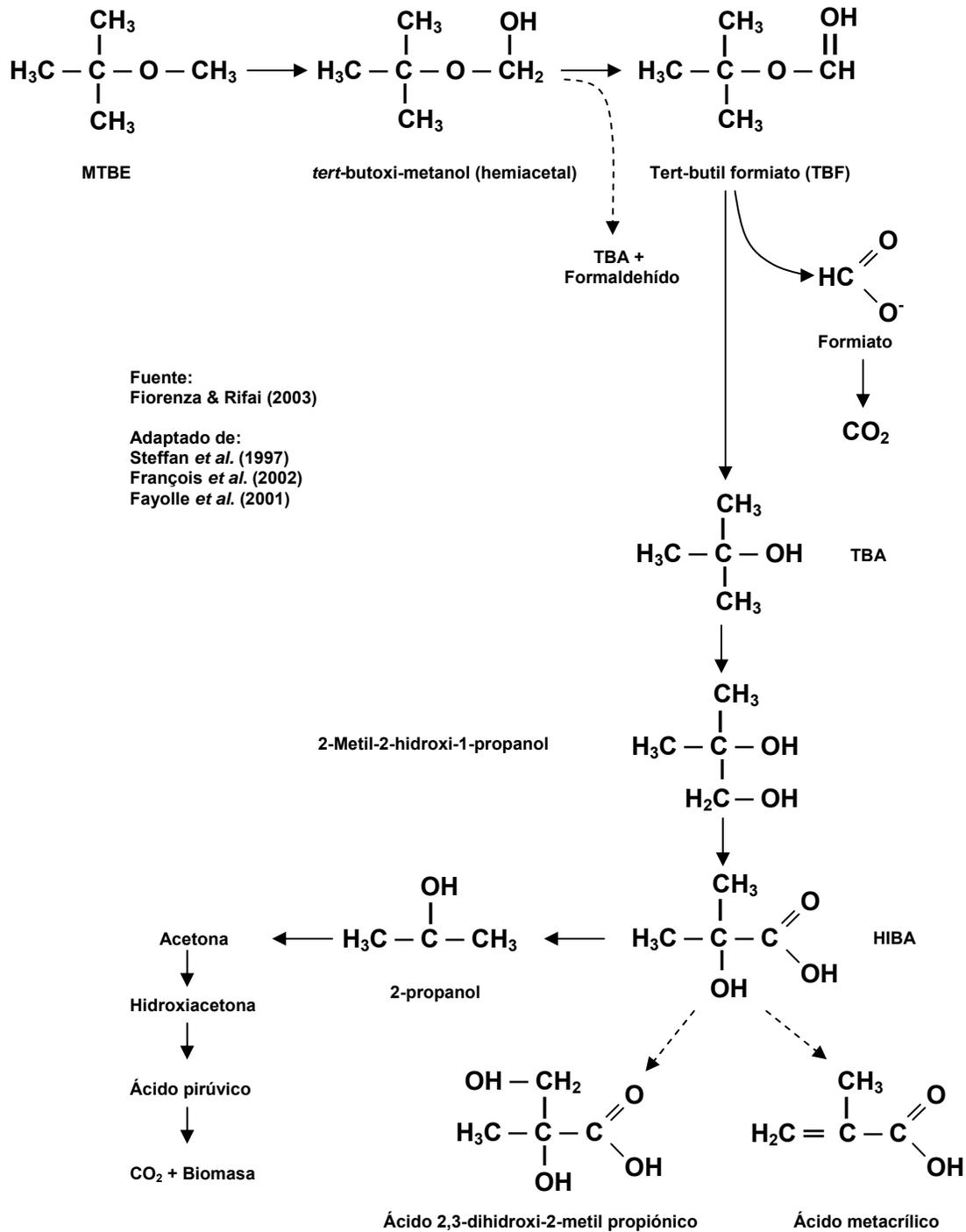


Figura 3.1 Ruta metabólica propuesta para la degradación aeróbica del MTBE.

Quizás un hallazgo sorprendente es que las monooxigenasas con poca especificidad aparente por sustrato, tales como aquellas que convierten metano a metanol (metano monooxigenasas) y amonio a hidroxilamina (amonio monooxigenasas) parecen incapaces de activar MTBE, mientras que enzimas más específicas, tales como aquellas capaces de activar alcanos gaseosos y alcanos ramificados simples, tienen actividades MTBE oxidantes (Prince 2000).

El rompimiento anaeróbico de éteres es la transmetilación, donde el grupo metilo parece ser transferido a un aceptor tal como el tetrahidrofoliato más que al agua. Este proceso ocurre en *Syntrophococcus* sp. (Dore & Bryant 1990), *A. woodii* (Berman & Frazer 1992), y *Sporomusa ovata* (Stupperich & Konle 1993) (Fiorenza & Rifai 2003).

En la Tabla 3.1 se presenta un resumen de las enzimas responsables de la biodegradación del MTBE por diferentes especies microbianas.

Tabla 3.1 Reacciones enzimáticas propuestas/postuladas para los pasos clave en la ruta de degradación aerobia de MTBE por cultivos puros.

Organismo(s)	Reacción	Posibles enzimas	Nota	Referencia
<i>Mycobacterium austroafricanum</i>	MTBE → TBA TBA → HIBA	MO* No hemo MO* No hemo	Inducible Inducible	François <i>et al.</i> (2002)
<i>Hydrogenophaga flava</i> ENV735	MTBE → TBA TBA → HIBA	Citocromo P-450	Constitutiva Inducible	Hatzinger <i>et al.</i> (2001)
<i>R. gelatinosus</i> PM1	MTBE → TBA TBA → HIBA	Diferentes enzimas para cada reacción	Inducible Inducible	Deeb <i>et al.</i> (2000b)
<i>Rhodococcus ruber</i> (<i>G. terrae</i>)	MTBE → TBA	Citocromo P-450		Hernández-Pérez <i>et al.</i> (2001)
<i>Arthrobacter</i> (ATCC 27778)	MTBE → TBA TBA → HIBA	La misma enzima para ambas reacciones	Crecido en butano. Prod. esteq. de TBA	Liu <i>et al.</i> (2001)
<i>Burkholderia</i> sp. CIP I-2052	TBA → HIBA	TBA-MO*?	Mineralización	Piveteau <i>et al.</i> (2001)
<i>Xanthobacter</i> <i>Mycobacterium vaccae</i> ENV 425	MTBE → TBA TBA → HIBA MTBE → TBA	La misma enzima Citocromo P-450 Citocromo P-450	Crecidos en butano Crecido en propano, se acumuló HIBA	Hyman <i>et al.</i> (1998) Steffan <i>et al.</i> (1997)
<i>Graphium</i> sp.	MTBE → TBA	Citocromo P-450	Crecido en n-butano	Hardison <i>et al.</i> (1997)

*Monooxigenasa

Fuente: Adaptado de Fiorenza & Rifai (2003)

Aunque el MTBE puede ser usado como la única fuente de carbono y energía, varios autores han reportado un muy bajo crecimiento medido como rendimiento de biomasa, densidad óptica, ensayos de proteína o número más probable (Salanitro *et al.* 1994, Fortin & Deshusses 1999a, b). Esto sugiere que o bien el MTBE tiene alguna actividad desacoplante o tóxica, o que alguna parte del metabolismo puede requerir una entrada

significativa de energía (Fiorenza & Rifai 2003). Sin embargo algunos investigadores han encontrado últimamente organismos con crecimiento aeróbico relativamente rápido en MTBE (Hanson *et al.* 1999, François *et al.* 2002). Los microorganismos, sus velocidades de degradación aeróbicas, y rendimientos celulares (si se conocen) se presentan en la Tabla 3.2.

3.3 Uso de hongos en la biodegradación de compuestos xenobióticos

En la naturaleza, los hongos son particularmente eficientes en degradar los principales polímeros de plantas (celulosa, hemicelulosa y lignina) pero también pueden descomponer un enorme arreglo de otras moléculas orgánicas, incluyendo ceras, gomas, cutículas de insectos, plumas y carne de animales. Aunque los microbiólogos industriales utilizan regularmente el metabolismo fúngico para cervecería, panificación, preparación de quesos y la producción de antibióticos, enzimas comerciales y un número de productos químicos, los hongos son mejor conocidos por su trabajo “sucio”. Ellos dañan nuestros alimentos, destruyen nuestras cosechas, pudren árboles maderables, y causan además algunas de las más repugnantes enfermedades. Además los hongos degradan un amplio rango de compuestos xenobióticos que dañan el ambiente, como: colorantes, plásticos, lubricantes, solventes, pinturas, pegamentos, hidrocarburos alifáticos, aromáticos sencillos y policíclicos, herbicidas, municiones, compuestos clorados, etc. (Alba *et al.* 2003, April *et al.* 2000, Braun-Lüllemann *et al.* 1997, Craig *et al.* 1995, Eilers *et al.* 1999, Prenafeta-Boldú *et al.* 2004, Sánchez *et al.* 2006). Varios autores han hecho listas conteniendo géneros de hongos que son capaces de degradar un amplio espectro de contaminantes (Barr & Aust 1994, Benett & Faison 1997, Pointing 2001). La microbiología de la degradación de xenobióticos constituye un campo de investigación bajo desarrollo, ya que los procesos microbiológicos pueden ser usados en los procesos de descontaminación (Solórzano *et al.* 2002). Paradójicamente, a pesar de esta notoriedad, el uso de hongos en estrategias de biorremediación para la recuperación de recursos naturales: aguas, aire y suelos, es limitado comparado con el uso de las bacterias.

Los hongos poseen algunos atributos que los distinguen de otras formas de vida y les permiten un buen potencial como agentes de degradación. Son capaces de crecer bajo condiciones ambientales de estrés, por ejemplo: ambientes con valores bajos de pH o pobres en nutrientes y con baja actividad de agua (Solórzano *et al.* 2002). El crecimiento micelial da una ventaja competitiva sobre las células individuales tales como las bacterias o levaduras, especialmente con respecto a la colonización de sustratos insolubles. En adición, los hongos pueden ramificarse rápidamente a través de los sustratos. El movimiento de las hifas a través del suelo, les da acceso a los sustratos y no están restringidos por un ambiente hidrofóbico. Similarmente, las hifas pueden penetrar en agregados de suelos que pueden ser internamente anóxicos. Además, muchos hongos son osmotolerantes (April *et al.* 2000). La alta superficie celular característica de los filamentos maximiza tanto el contacto mecánico como enzimático con el ambiente. Muchos hongos poseen enzimas extracelulares que pueden ayudar al metabolismo inicial de varios contaminantes (Cameron *et al.* 2000). Literalmente digieren su camino por la secreción de una batería de enzimas degradativas extracelulares. La naturaleza extracelular de las enzimas degradativas les permite a los

Tabla 3.2 Velocidades de degradación de oxigenantes por cultivos mixtos y puros.

Organismo	Tipo de Metabolismo	Velocidad de degradación de MTBE*	Velocidad de degradación de TBA*	Rendimiento celular	Referencia
Cultivo mixto (biolodos)	Heterotrófico			0.33-0.43 g DQO/g MTBE	Cowan & Park (1996)
Cultivo mixto BC1	Heterotrófico	12.9 nmol/mg prot-min		0.21-0.28 g/g MTBE	Salanitro <i>et al.</i> (1994)
<i>M. mesophilicum</i> <i>Rhodococcus</i> sp. <i>A. ilicis</i>	Metabolismo incompleto	0.18 mg/L·h			Mo <i>et al.</i> (1997)
ENV425	Cometabólico/ propano	2.1-9.2 nmol/mg prot-min	1.3-2.4 nmol/mg prot-min		Steffan <i>et al.</i> (1997)
ENV421		0.71-4.6 nmol/mg prot-min	0.53-1.6 nmol/mg prot-min		
<i>Graphium</i> sp.	Cometabólico/ n-butano. Células en soporte sólido	0.06 nmol/mg prot-min (sin butano) 0.002 nmol/mg prot-min (con butano) 0.35 nmol/mg prot-min (con butano en medio líquido)			Hardison <i>et al.</i> (1997)
<i>Xanthobacter</i> sp.	Cometabólico/ propano	5.9-15 nmol/mg prot-min	3.1 nmol/mg prot-min		Hyman <i>et al.</i> (1998)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cometabólico/ pentano	3.9 nmol/mg prot-min	0.95 nmol/mg prot-min		Garnier <i>et al.</i> (1999)
Cultivo mixto de filtro biolavador	Heterotrófico	1.9-3.8 nmol/mg prot-min		0.1 g/g MTBE	Fortin & Deshusses (1999a)
<i>Rubrivivax gelatinosus</i> PM1	Heterotrófico	0.7, 1.17, 3.56 µg/mL·h para MTBE 5, 50, 500 mg/L 50 mg/g ps·h		0.18 g/g MTBE	Hanson <i>et al.</i> (1999) Deeb <i>et al.</i> (1999)
<i>Burkholderia</i> sp. CIP 1-2052	Heterotrófico	No degradó	16.1 nmol/mg prot-min	0.54 g/g TBA	Piveteau <i>et al.</i> (2001)
<i>Hydrogenophaga flava</i> F55	Heterotrófico/ EL**	86 nmol/mg prot-min		0.4 g/g MTBE	Hatzinger <i>et al.</i> (2001)
Cultivo mixto (material acuífero)	Heterotrófico	0.4 mg/L·día			Kane <i>et al.</i> (2001)
<i>Arthrobacter</i> (ATCC 27778)	Cometabólico/ n-butano	13.6 nmol/mg prot-min	0.002 nmol/mg prot-min		Liu <i>et al.</i> (2001)
<i>R. ruber</i> IFP 2001)	Cometabólico/ ETBE Heterotrófico	28 nmol/mg prot-min 118 nmol/mg prot-min (ETBE)		- 0.20 g/g ETBE	Hernández-Pérez <i>et al.</i> (2001)
Cultivo mixto (suelo contam. gasolina)	Heterotrófico	1.1 mg/L·h			Kharoune <i>et al.</i> (2002)
Cultivo mixto (enriq. en MTBE)	Heterotrófico	0.01 mM/h	0.0185 mM/h		Sedran <i>et al.</i> (2002)
<i>Mycobacterium austroafricanum</i>	Heterotrófico	20 nmol/mg prot-min		0.44 g/g MTBE	François <i>et al.</i> (2002)
Cultivo mixto (licores mixtos y mat. acuíferos)	Heterotrófico	3.4 x 10 ⁻⁶ mmol/mg VSS-min			Wilson <i>et al.</i> (2002a)
Cultivo mixto	Heterotrófico	0.46 g/g TSS·día			Vainberg <i>et al.</i> (2002)
<i>M. vaccae</i> JOB5	Cometabólico/ propano	24.4 nmol/mg prot-min	10.4 nmol/mg prot-min		Smith <i>et al.</i> (2003a)
Consortios M1 y M2	Pentano Hexano Isooctano	9.3 nmol/mg prot-min 2.3 nmol/mg prot-min 6.1 nmol/mg prot-min			Morales <i>et al.</i> 2004

*Las unidades se homogenizaron para efectos de comparación. Se supuso un contenido de proteína celular del 50%

**Extracto de Levadura

Fuente: Adaptado de Deeb *et al.* 2000a, Fayolle *et al.* 2001, Fiorenza & Rifai (2003).

hongos tolerar concentraciones más elevadas de tóxicos químicos que lo que sería posible si estos compuestos tuvieran que ser llevados al interior de la célula. En adición, una gran variedad de enzimas intracelulares (p. ejemplo reductasas, metiltransferasas y citocromos P-450), contribuyen a la degradación de xenobióticos en modos poco comprendidos (Benett & Faison, 1997).

Los citocromos P-450 son oxidasas (monooxigenasas) derivadas de una superfamilia de genes que están involucrados en muchos de los pasos de la degradación de petróleo y en la biotransformación de una variedad de contaminantes ambientales. Tanto la detoxificación y la activación están asociadas con la acción de P-450. Las monooxigenasas fúngicas son más similares a los citocromos de los mamíferos que a los de las bacterias (Omura 1999, van den Brink *et al.* 1998).

La tecnología de la biorremediación ha recibido una atención creciente para la restauración de sitios contaminados, donde la biodegradación ocurre lenta o imperceptiblemente, al igual que el uso de biorreactores operativos que faciliten el contacto entre contaminantes y microorganismos.

La mayoría de los sistemas biológicos diseñados para el tratamiento de VOCs utilizan bacterias. Sin embargo, a menudo se presenta el desplazamiento microbiano de bacterias por hongos, pero las condiciones que llevan a este desplazamiento no son conocidas. Las condiciones de los biorreactores de baja humedad y baja disponibilidad de nutrientes pueden conducir a la invasión de hongos en los biorreactores bacterianos. Los aislados de la mayoría de los phyla taxonómicos de los hongos, han sido probados por su capacidad de metabolizar muchos compuestos no volátiles (Kim & Rhee 2003), pero se han probado muy pocos VOCs (Kennes & Veiga 2004). Algunas biopelículas fúngicas establecidas intencionalmente o sin intención por desplazamiento microbiano, se han desempeñado bien en biorreactores que degradan VOCs removiendo eficientemente compuestos tales como tolueno (van Groenestijn *et al.* 2001, García-Peña *et al.* 2001) y hexano (Arriaga & Revah 2005) de corrientes gaseosas. Además, muchos de los estudios de biodegradación fúngica de compuestos aromáticos se ha enfocado en la transformación vía cometabolismo, más que en su utilización como la única fuente de carbono y energía. Aunque el uso de hongos en el campo de la ingeniería ambiental se ha vuelto más generalizado, los hongos son aún subutilizados, especialmente en el área de la biofiltración.

3.4 Recapitulación

El MTBE y los otros compuestos oxigenantes, son más resistente a la biodegradación que muchas otras sustancias en gasolina reformulada, incluyendo BTEX. Sin embargo, contrario a los primeros reportes de la recalcitrancia del MTBE, ahora se ha establecido claramente que se degrada por un amplio rango de diferentes microorganismos tanto aeróbica como anaeróticamente, por cultivos mixtos como por cultivos puros, parcialmente a intermediarios y por completa mineralización a CO₂ y biomasa. Como única fuente de carbono y por cometabolismo. En general, se ha encontrado crecimiento lento, y bajos rendimientos, pero los microorganismos que están siendo aislados ahora, parecen ser

bastante bien adaptados a crecer en MTBE. Los biorreactores pueden alcanzar remociones significativas de corrientes influentes de MTBE. En los biorreactores, los cultivos mixtos parecen ofrecer un mejor desempeño que con cultivos puros. La degradación incompleta del MTBE ha sido observada, con formación de TBA e HIBA como los pasos limitantes. Algunos estudios de campo han sugerido que los microorganismos nativos pueden degradar MTBE, aunque en algunos casos se ha observado poca o ninguna atenuación de MTBE. Otras investigaciones de campo indican que la bioestimulación es requerida para limitar el transporte del MTBE. La adición de oxígeno podría estimular la biodegradación *in situ*, aunque en algunos casos no ha sido suficiente, lo cual sugiere la presencia de otra limitación. La adición de un co-sustrato (p. ej. alcanos) podría ser útil para la biorremediación *in situ* del MTBE. En sitios donde no hay degradación intrínseca del MTBE, la bioaumentación es una alternativa. La mayoría de los estudios de degradación de MTBE se han enfocado en bacterias y poco se conoce la contribución de los hongos filamentosos a este proceso, pero dadas sus características y habilidades degradativas, estos organismos pueden ser una buena alternativa para la biorremediación de sitios contaminados con oxigenantes de la gasolina.

CAPÍTULO IV

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La contaminación del aire y agua con MTBE es preocupante debido a los problemas de salud y ecológicos asociados con su liberación ambiental. Debido a esto se han estudiado diferentes sistemas tanto fisicoquímicos como biológicos para degradar oxigenantes. El potencial de los microorganismos como agentes degradadores de MTBE, señala los tratamientos biológicos como una alternativa promisoría para remover esta sustancia. Es sabido que los principales microorganismos degradadores de oxigenantes son bacterias, aunque también se ha reportado un hongo. Sin embargo, los hongos filamentosos presentan algunas características que les permiten una viabilidad poco explorada como agentes degradadores. Es necesario aislar y estudiar hongos capaces de degradar compuestos como el MTBE, con características que los hagan potencialmente disponibles para la biocatálisis en biorreactores que traten corrientes de aire o de agua contaminadas con estos compuestos.

Por lo tanto el objetivo de este trabajo plantea la obtención de hongos filamentosos capaces de degradar MTBE y otros oxigenantes de la gasolina además de comprender las condiciones en las cuales esta degradación se lleva a cabo con miras a su posible empleo en sistemas de tratamiento de corrientes de aire o agua contaminadas con oxigenantes.

OBJETIVOS

Objetivo General

Contribuir al estudio de la biodegradación de los compuestos oxigenantes de la gasolina, MTBE, ETBE, TAME y TBA mediante el uso de hongos filamentosos.

Objetivos particulares

- Evaluar la capacidad de cepas puras de hongos filamentosos provenientes de diferentes fuentes para crecer en MTBE, gasolina y algunos compuestos particulares de gasolina.
- Obtener por técnicas de enriquecimiento, cultivos fúngicos de muestras de sitios contaminados con gasolina.
- Evaluar la capacidad de los cultivos obtenidos de biodegradar MTBE como única fuente de carbono y energía o por cometabolismo.
- Evaluar el potencial de propagación de los cultivos con sustratos de crecimiento de fácil asimilación sin perder la capacidad de degradación de los oxigenantes.
- Estudiar las cinéticas de degradación a nivel de microcosmos de MTBE, ETBE, TAME y TBA.
- Determinar la capacidad de los cultivos fúngicos para crecer en algunos de los intermediarios de la ruta de degradación de MTBE aceptada para bacterias.

CAPÍTULO V

MATERIALES Y MÉTODOS

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Estrategia experimental

A continuación se describen los estudios realizados para la obtención y la caracterización de cultivos fúngicos degradadores de MTBE, los cuales incluyen las fases de enriquecimiento en varios sustratos, el monitoreo de la actividad degradativa, el aislamiento de cultivos puros, además de estudios en microcosmos para la caracterización cinética de los cultivos.

En la Figura 5.1 se muestra la estrategia experimental desarrollada durante el estudio de degradación de MTBE por cultivos fúngicos.

La técnica de enriquecimiento en medios líquidos o en medios sólidos con vapores de diferentes sustancias (atmósferas controladas), permitió la adaptación y la obtención de cultivos capaces de crecer en los sustratos de interés a partir de cepas puras que nunca estuvieron en contacto con tales sustancias y de cultivos mixtos que si han estado en contacto pero que crecen en una matriz sólida compleja como suelos contaminados o el material de soporte de un biofiltro. El crecimiento en medios sólidos con atmósferas controladas permite una evaluación cualitativa adecuada y relativamente rápida de la adaptación a los sustratos, especialmente cuando se tienen muchos cultivos por probar.

El uso de medios de cultivo específicos como YNB o BH, agregó un factor selectivo para el desarrollo de cultivos fúngicos capaces de crecer en MTBE y/o en hidrocarburos, debido tanto a la composición como al pH de estos medios.

Una vez que se seleccionaron los cultivos que mostraron resultados positivos de crecimiento en los sustratos, la adaptación en medio líquido permitió la evaluación cuantitativa de la degradación mediante el monitoreo de las concentraciones de los sustratos y de la respiración (O_2 , CO_2). Los cultivos líquidos permitieron además los estudios de degradación cometabólica del MTBE.

Los experimentos en microcosmos nos permitieron realizar estudios cinéticos de degradación de MTBE y de otros sustratos y de algunos intermediarios de la ruta metabólica del MTBE aceptada para bacterias. También se hicieron estudios de mineralización con ^{14}C -MTBE para investigar el destino del carbono del MTBE. Ya comprobada la capacidad de degradación de MTBE como única fuente de carbono y energía o por cometabolismo, en el caso de los cultivos mixtos fue necesario hacer aislamientos y estudios para determinar la capacidad degradativa de estos aislados. Debido a que en muchos ejemplos de la literatura, la capacidad degradativa de MTBE es inducida y se pierde al crecer un medio rico, siendo en algunos casos muy difícil y aún imposible de recuperar, y debido a que en general los rendimientos en MTBE son muy bajos, fue necesario buscar sustratos de crecimiento alternativo que permitan la propagación de los cultivos sin perder la habilidad degradativa.

5.2 Inóculos

5.2.1 Microorganismos

Para la realización de este trabajo se utilizaron los siguientes cultivos:

a) 23 cepas puras de hongos filamentosos (numeradas como *H1* a *H23*), cuyo origen se describe a continuación: 15 cepas (*H1* a *H15*) de muestras de diferentes biofiltros de la Planta Piloto U4 de la UAM-I que operaban con diferentes compuestos volátiles; una cepa aislada de una muestra de lubricantes industriales contaminada con hongos (*H16*); tres cepas aisladas en el Laboratorio de Residuos Sólidos de la UAM-I, (*H17* a *H19*) con capacidad de crecer en suelos contaminados con petróleo; una cepa (*H20*) de colección (ATCC 200478, *Pycnoporus cinnabarinus*); y tres hongos filamentosos proporcionados por el Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), de Marsella, Francia: *Aspergillus terreus* (*H21*), *A. japonicus* (*H22*) y *P. cinnabarinus* (*H23*) que mostraron crecimiento aparentemente positivo en medio sólido en atmósferas de MTBE en experimentos previos.

b) Dos consorcios mixtos obtenidos mediante técnicas de enriquecimiento en vapores de MTBE derivados de un cultivo adaptado a crecer con vapores de gasolina de muestras de suelos contaminados con gasolina Magna de los estados de Veracruz y Puebla (ver Figura 5.1). El cultivo denominado *Consortio H* se propagó en medio mineral Yeast Nitrogen Base sin aminoácidos (YNB a pH 5.5 para favorecer el crecimiento de hongos) y el cultivo *Consortio B* enriquecido en medio Bushnell-Haas (BH, un medio mineral mínimo a pH 7.0 propuesto para la propagación de organismos degradadores de hidrocarburos, Difco 2006).

c) Un consorcio denominado *Consortio S*, proveniente de un biofiltro degradador de hexano de la Planta Piloto U4 de la UAMI formado inicialmente por dos hongos: *Fusarium* sp. y *Cladosporium* sp, así como de bacterias (Arriaga & Revah 2005). Posteriormente, de este consorcio se aisló la cepa de *Fusarium* sp. y se le identificó como *Fusarium solani* mediante sus caracteres morfológicos utilizando la tabla sinóptica para el género *Fusarium*, (Gams *et al.* 1980). Esta cepa posteriormente se envió al Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht, Países Bajos, en donde se confirmó su clasificación y se depositó como *Fusarium solani* CBS 117476.

d) Un consorcio microbiano (denominado *UAMI*) que contiene al menos un hongo filamentosos, obtenido de muestras de suelos contaminados con gasolina y de una muestra de un biofiltro que degradaba pentano y MTBE por cometabolismo en la Planta Piloto U4 de la UAMI (Dupasquier *et al.* 2002).

e) Para fines de comparación, se utilizó como referencia un cultivo bacteriano mixto degradador de MTBE denominado *Consortio F*, obtenido en la Universidad de California, Riverside (Fortín *et al.* 2001).

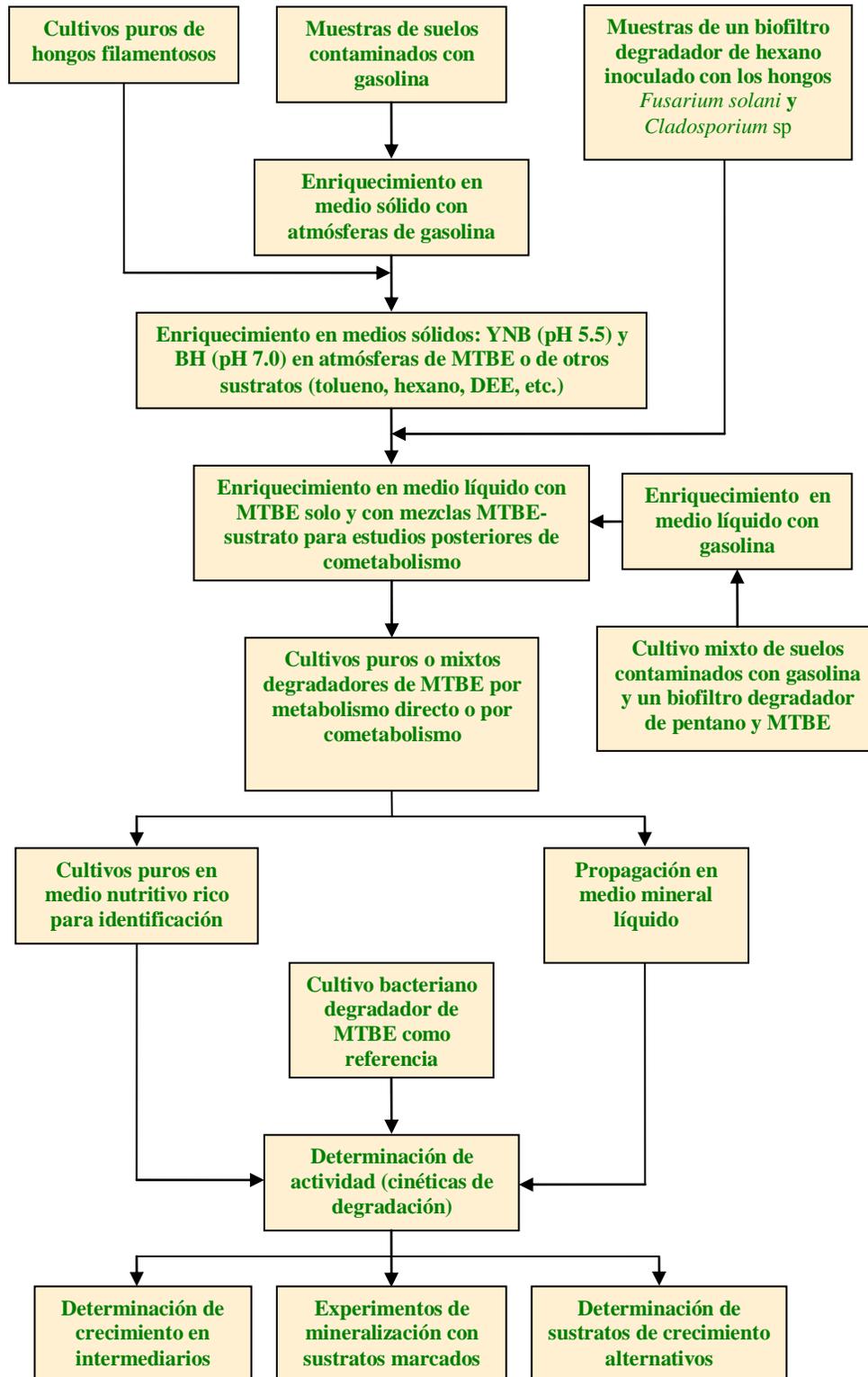


Figura 5.1 Estrategia experimental desarrollada para el estudio de la degradación de MTBE por cultivos fúngicos.



Figura 5.2 Recipientes utilizados para el enriquecimiento en medios sólidos en atmósferas controladas de los vapores de los sustratos estudiados.



Figura 5.3 Enriquecimiento en medio líquido del Consorcio *UAMI* en gasolina.



Figura 5.4 Reactores de membrana para el mantenimiento y la propagación de degradadores de MTBE.

5.2.2 Adaptación

Para la propagación inicial de los microorganismos, se realizaron cultivos de adaptación en medios líquidos y medios sólidos. En el caso de los medios sólidos, los cultivos en placas Petri se colocaron en desecadores de vidrio o en frascos de vidrio de aproximadamente 2 L de capacidad herméticamente sellados (Figura 5.2). Para lograr las atmósferas controladas de los sustratos (gasolina, MTBE, TBA, hexano, tolueno, DEE, los tres últimos para estudios de cometabolismo), se emplearon bases de placas Petri (en el caso de los desecadores) o tubos de ensaye de 15 mL (en el caso de los frascos) conteniendo aproximadamente 3 g de carbón activado en donde se adicionaba 1 mL del sustrato, lo cual permitió su gradual evaporación. En el caso del TBA, debido a que es menos volátil que los otros compuestos, se agregó directamente en las placas Petri (1 mL/L) antes de solidificar el medio, además del agregado en el tubo de ensaye. Aproximadamente una vez por semana se abrían los recipientes para airearlos y se adicionaba una nueva cantidad de sustrato. Los microorganismos se sembraron por duplicado. Como controles negativos se inocularon cajas sin fuente de carbono (atmósfera de aire solamente) y como controles positivos medio con glucosa como único sustrato de crecimiento. Los recipientes se incubaron a 30 °C. La adaptación en medios sólidos se realizó aproximadamente por 4 meses. El crecimiento en los sustratos probados se evaluó por comparación con el crecimiento en los controles. En el caso de la adaptación en medio líquido, para el consorcio *UAMI* con gasolina se utilizó un matraz erlenmeyer de 1 L sellado con un tapón de goma forrado con teflón y papel Parafilm® (Figura 5.3) conteniendo medio litro de medio mineral (Tabla 5.1). Para las demás adaptaciones en medio líquido (a menos que se indique lo contrario), se utilizaron matraces erlenmeyer de 125 mL con tapón de baquelita o válvulas Mininert® con rosca, con MTBE como única fuente de carbono o con mezclas MTBE-sustrato para evaluar posible cometabolismo. Los matraces se incubaron a 30 °C en agitación a 150 rpm. Las adaptaciones en medio líquido se realizaron en aproximadamente 3 meses. También en este caso fue necesario abrir periódicamente los frascos para airearlos y adicionar una nueva cantidad de sustratos.

5.2.3 Mantenimiento y propagación de los consorcios *UAMI* y *F*

Para el crecimiento de los consorcios *UAMI* y *F* se emplearon dos reactores de membrana alimentados periódicamente con MTBE (Figura 5.4), consistentes en recipientes de vidrio con un sistema de agitación y con un soporte interior alrededor del cual se enrolló una manguera de silicón (Cole Parmer, 1/32" de pared), de tal forma que ambos extremos quedaran por fuera del reactor. El recipiente se llenó completamente con medio mineral (Tabla 5.1) y se aireaba indirectamente con una bomba que circulaba aire a través de la manguera ya que el silicón es permeable al oxígeno y al CO₂ pero poco permeable al MTBE. Los microorganismos formaron una biopelícula en las paredes exteriores de la manguera. Los reactores se incubaron a temperatura ambiente.

5.3 Medios de cultivo

La propagación de los hongos (*H1* a *H20*) se realizó en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) de Sigma-Aldrich. Los hongos *H21* a *H23* se propagaron en medio MYA (Malta: 1 g/L;

Extracto de levadura: 20 g/L; Agar: 20 g/L). El enriquecimiento inicial de las muestras de suelos contaminados en vapores de gasolina se hizo en el medio mineral MM1 (modificado de Fortín & Deshusses 1999a, ver Tabla 5.1). El cultivo derivado de los suelos y las cepas puras (*H1* a *H23*) se enriquecieron posteriormente en medio YNB sin aminoácidos (Sigma-Aldrich) y en medio BH (Difco). Cuando fue necesario utilizar medios minerales sólidos, se agregó Agar Noble (Difco): 20 g/L. El consorcio *UAMI* y el consorcio *F* se cultivaron en medio MM1. El consorcio *S* se cultivó en medio MM2 (ver Tabla 5.2). Los cultivos fúngicos derivados de los cultivos mixtos se cultivaron en medio PDA para propósitos de identificación, excepto los hongos derivados del consorcio *S* que se cultivaron en medio MM2 adicionado con 5 g/L de extracto de malta (Amresco, EUA) o en medio YPGA (Extracto de levadura: 3 g/L; Peptona de caseína: 10 g/L; Glucosa: 20 g/L; Agar: 20 g/L).

Tabla 5.1 Medio Mineral MM1.

Compuesto	Concentración g/L	Solución de Elementos Traza	
		Compuesto	Concentración g/L
K ₂ HPO ₄	2.00	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.4400
KH ₂ PO ₄	1.00	MnSO ₄ ·H ₂ O	0.8411
KNO ₃	1.00	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.2621
Medio YNB sin aa.	1.00	H ₃ BO ₃	0.0620
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.50	NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.0900
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.018	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.4900
Solución Elementos Traza	5 mL	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.2000
pH	6.8-7.0		

Fuente: Modificado de Fortín & Deshusses 1999a, elementos traza modificados de Meynell *et al.* 1970

Tabla 5.2 Medio Mineral MM2.

Compuesto	Concentración g/L	Compuesto	Concentración g/L
NaNO ₃	18.0	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.015
KH ₂ PO ₄	1.30	MnSO ₄ ·H ₂ O	0.012
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.38	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0025
CaSO ₄ ·2H ₂ O	0.25	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0015
CaCl ₂	0.055	H ₃ BO ₃	0.0015
pH	4.5-5.0	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.013

Fuente: Arriaga & Revah 2005

Los medios se esterilizaron a 121 °C por 20 minutos antes de inocularse. Una excepción fue cuando se usó medio YNB; éste se esterilizó, disolviéndolo en agua destilada y filtrándolo en una membrana hidrofílica de 0.22 µm de diámetro de poro para evitar su desnaturalización por calor.

En este trabajo se observó que cuando los microorganismos degradadores de MTBE se cultivaron con fines de propagación y/o purificación en medios ricos, perdían su capacidad degradativa, por lo que se cultivaron en medios minerales con antibióticos con el fin de eliminar las bacterias y purificar los hongos de un cultivo mixto. Ya que no fue posible la completa purificación de los hongos de esta forma, los antibióticos se usaron para favorecer el crecimiento ya sea de los hongos (inhibiendo las bacterias con antibacteriales) o de las bacterias (inhibiendo los hongos con antifúngicos) en el cultivo mixto y poder evaluar así el papel que estos dos grupos microbianos desempeñan en la degradación de los compuestos de interés. Los antibacteriales empleados fueron: cloranfenicol (20 mg/L disuelto en etanol) y gentamicina (50 mg/L disuelto en agua). Como antifúngico se usó una suspensión de nistatina (50 mg/L en agua). Las soluciones de cloranfenicol y sulfato de gentamicina se esterilizaron por filtración usando una membrana de 0.22 µm de diámetro de poro para evitar su desnaturalización por calor; la nistatina no se pudo filtrar por ser una suspensión, por lo que se utilizó sin esterilizar.

5.4 Reactivos

Dietil éter (99.9%, $\rho = 0.713 \text{ g/cm}^3$) y MTBE (>99%, $\rho=0.740 \text{ g/cm}^3$) fueron de J.T. Baker (Xalostoc, México); *n*-Hexano (95%, $\rho=0.66 \text{ g/cm}^3$) de Teqsiqum, (México); ETBE (99%, $\rho=0.742 \text{ g/cm}^3$), HIBA (98%), TAME (97%, $\rho=0.77 \text{ g/cm}^3$), Tolueno (99.5%, $\rho = 0.87 \text{ g/cm}^3$), Cloranfenicol, Gentamicina y Nistatina fueron de Sigma Aldrich (Milwaukee, WIS, EUA); TBA (99.5%, $\rho=0.77 \text{ g/cm}^3$) fue de Merck (Darmstadt, Alemania); ^{14}C -MTBE en etanol con una actividad específica de 5.8 mCi/mmol fue de Perkin Elmer Life Sciences Inc. (Boston, MA, EUA). El líquido de centelleo ScintiVerse II fue de Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, EUA). MHP se preparó en el Departamento de Química de la UAMI por Eduardo González y tuvo una pureza >85% por NMR. Todos los otros compuestos fueron obtenidos de proveedores comerciales y fueron de la más alta pureza disponible.

5.5 Determinaciones analíticas

5.5.1 Técnicas cromatográficas

Cuantificación de oxigenantes y *n*-hexano en fase gas. La concentración de los oxigenantes se determinó en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard), modelo 5890 serie II con un detector de ionización de flama (GC-FID). Para la detección de los compuestos estudiados, se inyectaron periódicamente (dependiendo de la velocidad de degradación) 250 µL de la fase gaseosa (headspace) de los microcosmos, con una jeringa para gases Precision sampling[®], (Rouger, Lousiana) de 0.250 mL de capacidad a una columna capilar de metil

silicón de 30 m de longitud, diámetro interno de 0.32 mm y película de 0.25 μm (Quadrex Corporation, EUA). Como gas acarreador se usó nitrógeno (Praxair, México) a un flujo de 1.5 mL/min. Las condiciones de trabajo fueron: inyector 180 °C, columna 40 °C, detector 210 °C, atenuación 4 y rango 3. El flujo del hidrógeno fue de 30 mL/min y el flujo del aire de 300 mL/min.

Cuantificación de O_2 y CO_2 . La determinación de la respiración (consumo de oxígeno y producción de bióxido de carbono) se realizó inyectando 250 μL del headspace del microcosmos en un cromatógrafo de gases GOW MAC (serie 550) con un detector de conductividad térmica (GC-TCD), con una columna concéntrica CTR-1, (Alltech, EUA) con helio (Praxair, México) como gas acarreador a una velocidad de flujo de 65 mL/min. Las temperaturas de operación fueron: inyector 30 °C, detector 70 °C y columna 30 °C. La corriente fue de 100 mA.

Las mediciones en GC-FID se hicieron por triplicado. Las lecturas proporcionadas por el cromatógrafo (área bajo la curva) se convirtieron en concentraciones (mg/mL) en fase gas o en fase líquida según el compuesto, mediante curvas estándar.

Determinación de concentraciones en la fase líquida. En el caso de los oxigenantes como el MTBE, TAME, ETBE y TBA, que son compuestos volátiles pero muy solubles en fase acuosa, se calculó un coeficiente de partición aire-medio de cultivo (Coeficiente adimensional de la Ley de Henry) con la finalidad de determinar la concentración de estos compuestos en el medio de cultivo, a partir de la medición en la fase gaseosa de cada microcosmos. Para tal efecto se realizó una curva estándar de cada oxigenante con una serie de 10 frascos sin líquido, únicamente con aire. De esta serie se determinó la concentración de los compuestos en fase gaseosa (C_{gas}) como una función lineal del área bajo la curva (ABC_{gas}) medida por cromatografía (los coeficientes de regresión fueron en general superiores a 0.990):

$$C_{\text{gas}} = m * \text{ABC}_{\text{gas}} + b \quad (5.1)$$

A partir de una segunda serie de frascos, esta vez conteniendo determinada cantidad de medio de cultivo, se midieron las áreas bajo la curva en la fase gaseosa, y con la función (5.1) calculada con la primera serie, se determinó la concentración de oxigenante en el gas (headspace) de cada frasco. Puesto que se conocen los volúmenes de líquido, de aire y la cantidad total de oxigenante en cada frasco, se estableció la concentración en el líquido. Una vez calculadas las concentraciones en fase gaseosa y en fase líquida, la pendiente de la recta C_{liq} vs. C_{gas} será el Coeficiente de partición gas/líquido $C_{p_{\text{gas/liq}}}$:

$$C_{p_{\text{gas/liq}}} = \frac{\text{Concentración en el gas}}{\text{Concentración en el líquido}} \quad (5.2)$$

Combinando las relaciones (5.1) y (5.2) tenemos:

$$\text{Concentración en el líquido} = \frac{m * ABC_{\text{gas}} + b}{C_{p_{\text{gas/líq}}}} \quad (5.3)$$

En la Tabla 5.3 se indican los coeficientes determinados para los oxigenantes estudiados. El valor calculado dependió del medio de cultivo utilizado.

Tabla 5.3 Coeficientes de partición adimensionales aire-medio de cultivo a 30 °C.

Compuesto	Coefficiente de partición aire/medio de cultivo a 25 °C	Coefficientes aire/agua a 25 °C*
MTBE	0.035-0.060	0.022-0.12
ETBE	0.063-0.093	0.11
TAME	0.050-0.070	0.052-0.081
TBA	0.0004-0.0009	0.00048-0.00059

*Ver tabla 2.1

En el caso del *n*-hexano (muy poco soluble), se prefirió medir la concentración en el headspace en lugar de la fase líquida. En cuanto al HIBA y MHP, debido a que son muy solubles y muy poco volátiles, no se pudo medir directamente su concentración mediante GC. En estos casos su degradación se determinó indirectamente mediante respirometría (consumo de oxígeno y producción de bióxido de carbono).

5.5.2 Cuantificación de biomasa

La biomasa se determinó indirectamente mediante la medición de proteína por el método de Lowry en un espectrómetro Spectronic 20D (Milton Roy Company, EUA) a 590 nm en celdas de vidrio de 10 cm de longitud. Como blanco se utilizó medio de cultivo estéril. Para la curva estándar se utilizó seroalbúmina bovina.

Ya que la biomasa en general creció en forma de gránulos o de agregados macroscópicos, antes de poder determinar su contenido de proteína o de usarla como inóculo en algún experimento, fue preciso dispersarla en un homogenizador manual de vidrio (Pirex[®]) con el fin de obtener una suspensión microbiana homogénea.

En muchos casos, el incremento en la biomasa después de crecer en alguno de los sustratos fue tan pequeño que no fue posible determinarlo mediante la medición de proteína, en estos casos, el rendimiento se determinó mediante la producción de CO₂ suponiendo que el carbono no mineralizado se incorporó como biomasa (fórmula elemental CH_{1.79}O_{0.5}N_{0.2} con 5% de sales, Ertola *et al.* 1994. Ver apéndice A).

5.6 Microcosmos

5.6.1 Experimentos cinéticos

Los experimentos de degradación de los compuestos estudiados se realizó en reactores cerrados (microcosmos) de 60 mL, 125 mL, 160 mL o 600 mL según el experimento, sellados con válvulas Mininert[®], bajo condiciones aeróbicas. Cada botella contenía 5 mL, 10 mL o 25 mL (dependiendo del experimento) de alguno de los medios de cultivo descritos anteriormente. Las botellas se inocularon con aproximadamente 10% v/v de una suspensión microbiana descrita en la sección anterior. Previamente se determinó el contenido de proteína de esta suspensión para conocer la cantidad inicial de biomasa de cada microcosmos. Al final de cada experimento también se midió la cantidad de proteína para determinar el incremento de biomasa. Los sustratos líquidos se añadieron con una microjeringa Hamilton[®] (Reno, Nevada, EUA) de 10 µL de capacidad. En el caso del HIBA que es una sal o del MHP que es un líquido muy viscoso, fue necesario hacer diluciones previas en medio de cultivo para poder adicionarlas con la microjeringa. Las botellas se incubaron en condiciones controladas a 30 °C y se agitaron en un agitador rotatorio a 150 rpm. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

Cada experimento consistió de las siguientes unidades experimentales:

- Dos botellas adicionadas con el oxigenante o intermediario a estudiar
- En el caso de los estudios de cometabolismo dos botellas con el oxigenante más el sustrato (fuente de carbono y energía)
- Dos botellas sin ninguna fuente de carbono para determinar la respiración endógena del cultivo.
- Dos botellas con el compuesto a estudiar sin inocular para determinar posible degradación abiótica.

5.6.2 Determinación de las tasas de degradación

Las tasas de degradación de sustrato o de producción de CO₂ indican la cantidad de sustrato consumido (o de CO₂ generado) por unidad de tiempo por unidad de biomasa. Los datos experimentales se ajustaron mediante el modelo de Gompertz, una función asintótica desarrollada por Benjamín Gompertz en 1825 que ha sido utilizada para modelar el crecimiento tanto de plantas (Hunt 1982), como de bacterias (Zwietering *et al.* 1990). Este modelo tiene tres parámetros arreglados como una doble exponencial:

$$Y = \alpha \exp(-\beta \exp^{-kX}) \quad (5.4)$$

Donde:

Y = es la variable aleatoria a estimar

α = es la máxima cantidad de Y cuando el tiempo se incrementa indefinidamente
(sus unidades serán las mismas que Y)

β = es un parámetro adimensional de ajuste

κ = es la razón de cambio específico de la variable dependiente con respecto a la variable independiente. (si X = tiempo sus unidades serán: 1/tiempo)

X = es la variable independiente, en este caso será tiempo.

En nuestro caso, la variable Y representa la concentración de sustrato consumido (o de CO₂ generado) en unidades de mg/mL.

Para obtener la velocidad máxima de consumo de sustrato o generación de CO₂, se derivó el modelo de Gompertz, esto es, la derivación de Y con respecto al tiempo obteniéndose la siguiente expresión:

$$V_{\text{máx}} = 0.368 \alpha \kappa \quad (5.5)$$

La velocidad máxima específica de consumo de sustrato o generación de CO₂ se obtuvo al dividir la velocidad máxima volumétrica (mg/mL·h) calculada mediante la ecuación 5.5 por la concentración final de proteína (mg proteína/mL), expresándose por lo tanto en unidades de mg/mg proteína_{inicial}·h. Ya que el incremento en biomasa de cada experimento fue muy pequeño y en ocasiones no detectable por la medición de proteína, se decidió usar el valor final como representativo de la cantidad de biomasa durante todo el tiempo que duró cada experimento.

5.6.3 Experimentos de mineralización

Para estos experimentos se utilizó ¹⁴C-MTBE uniformemente marcado disuelto en etanol con una actividad específica de 5.8 mCi/mmol. El experimento se realizó en botellas de 160 mL. La radioactividad inicial fue de 1.66 x 10⁻⁴ mCi. La incubación se realizó bajo las mismas condiciones que los experimentos cinéticos. La liberación de ¹⁴CO₂ se analizó como se describe en Fortin *et al.* (2001).

5.6.4 Experimentos con sustratos alternativos de crecimiento

Los rendimientos observados para MTBE con los cultivos estudiados son muy bajos y los microorganismos pierden la capacidad de degradación al crecer en un medio rico. Por esta razón se experimentó el crecimiento de un cultivo degradador de MTBE y TBA (consorcio S) en algunos compuestos que se pensó podrían sostener el crecimiento sin perder la capacidad de degradación de los oxigenantes. Se observó que los cultivos con cloranfenicol crecían mejor que sin antibiótico, una posible explicación es que el etanol usado como solvente del antibiótico serviría como un buen sustrato de crecimiento. Se eligieron como sustratos probables además del etanol (Bekri & Pauss 2002), glicerol (Johnson *et al.* 2004), extracto de malta (Spigno *et al.* 2003, Arriaga & Revah 2005) y dos compuestos que forman parte del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Johnson *et al.* 2004): ácido cítrico y málico. Los cultivos se desarrollaron en matraces erlenmeyer de 1 L conteniendo 100 mL de medio mineral (medio MM2). Los matraces se inocularon con diez a quince gránulos del cultivo crecido en MTBE o TBA y se alimentaron con 5 g/L de los sustratos. Se cubrieron

con tapones de algodón estériles y se incubaron a 30 °C a 100 rpm. Después de aproximadamente una semana de incubación, la biomasa desarrollada en cada sustrato se recuperó por filtración, se lavó con solución salina isotónica (0.85 % NaCl), se dispersó mediante un homogenizador manual de vidrio y se utilizó como inóculo de microcosmos (10 % de inóculo v/v) alimentados con TBA o MTBE.

5.7 Observaciones al Microscopio Electrónico de Barrido (SEM)

Se tomaron muestras de gránulos del consorcio *H* cultivado a pH 4.5 (ver sección 6.1.1.2). Los microorganismos se fijaron con glutaraldehído al 6% y osmio al 2% y deshidrataron gradualmente con mezclas de 30, 50, 70, 90 y 100% de etanol-agua. Posteriormente las muestras se secaron en un desecador de punto crítico y recubrieron con oro para su observación al microscopio electrónico de barrido (Bozzola & Russell 1991).

CAPÍTULO VI

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Cepas puras de hongos y los consorcios *H* y *B*

6.1.1 Evaluación del crecimiento en atmósferas controladas

La adaptación de las 23 cepas puras de hongos filamentosos mencionadas en Materiales y Métodos (sección 5.2.1 a) y del cultivo derivado de suelos contaminados con gasolina Magna (sección 5.2.1 b), se efectuó en placas Petri con medios YNB o BH. Para tal fin, las placas se colocaron en atmósferas de los siguientes sustratos: gasolina Magna, tolueno (como representante de los compuestos aromáticos de la gasolina), *n*-hexano (como representante de los alcanos), DEE (debido a su estructura éter), MTBE y TBA.

Tabla 6.1 Evaluación del crecimiento en medio sólido de cepas fúngicas y dos consorcios con atmósferas controladas de diferentes sustratos. Se utilizó una escala cualitativa con cinco niveles: ++ (muy bueno), + (bueno); +/- (regular); - (poco) y -/- (nulo o similar a los controles negativos, ver sección 5.2.2).

Cultivo	Gasolina	Tolueno	MTBE	TBA	Hexano	DEE
<i>H-1</i>	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>H-2</i>	++	+	-/-	-/-	+	+
<i>H-3</i>	+	+	-/-	-/-	+	+
<i>H-4</i>	+	+/-	-/-	-/-	-/-	+
<i>H-5</i>	+/-	++	-/-	-/-	-/-	-
<i>H-6</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>H-7</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>H-8</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>H-9</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>H-10</i>	+	-/-	-/-	-/-	+	-/-
<i>H-11</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>H-12</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>H-13</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>H-14</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>H-15</i>	-/-	+	-/-	-/-	-	-
<i>H-16</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>H-17</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>H-18</i>	-/-	+	-/-	-/-	-	-
<i>H-19</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>H-20</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>H-21</i>	NP	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>H-22</i>	NP	-/-	-	-/-	-	-/-
<i>H-23</i>	NP	-/-	-	-/-	-	-/-
Consortio <i>H</i>	++	NP	-	-	++	++
Consortio <i>B</i>	++	NP	-	-	-/-	-/-

NP = No se probó

La Tabla 6.1 muestra que sólo las cepas puras *H-22* y *H-23* y los consorcios *H* y *B* presentaron un crecimiento en MTBE ligeramente superior a los controles negativos. Únicamente los consorcios *H* y *B* mostraron poco crecimiento en TBA. Ambos consorcios

mostraron un crecimiento muy bueno en gasolina, además el consorcio *H* logró un crecimiento muy bueno en hexano y en dietil éter. El consorcio *B* aparentemente estaba compuesto sólo por bacterias (al observarse al microscopio y por cultivos en medio sólido), mientras que el consorcio *H* contenía un hongo y al menos un coco Gram negativo (Figura 6.1). Los hongos que mostraron mejor crecimiento en gasolina, tolueno, hexano o DEE (y potencial para la degradación cometabólica del MTBE) fueron las cepas *H-1* a *5*, *H-10*, *H-15* y *H-18*.

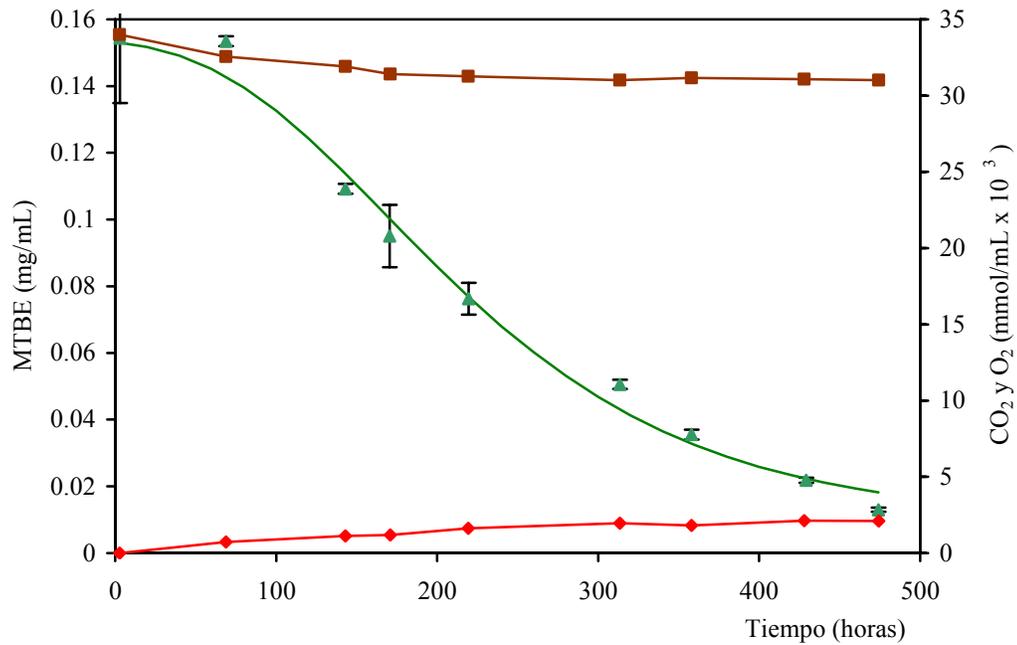
6.1.2 Adaptación y evaluación de la capacidad degradativa del consorcio *H* y del consorcio *B*.

Los cultivos puros con mejor crecimiento y los consorcios *H* y *B*, se sembraron en medio mineral líquido (YNB o BH, respectivamente) con 180 ppm de MTBE como única fuente de carbono o en mezclas MTBE-tolueno, MTBE-hexano y MTBE-DEE para evaluar cometabolismo potencial. El inóculo en cada caso se obtuvo raspando la biomasa de la superficie de las placas. El consumo de los sustratos y la respiración de los cultivos se monitorearon mediante cromatografía GC-FID y GC-TCD respectivamente.

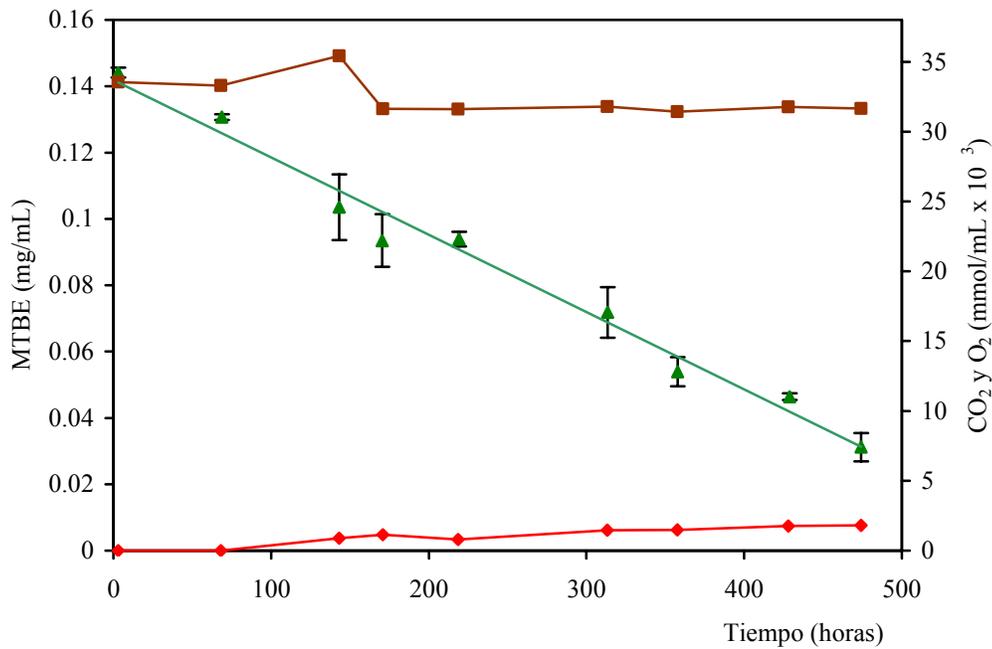
Ninguna de las cepas puras pudo degradar MTBE ya sea como única fuente de carbono y energía ni por cometabolismo con los sustratos estudiados. Los ensayos preliminares mostraron resultados positivos de degradación de MTBE solamente en dos casos: con los consorcios *B* y *H*. Las cinéticas de degradación se muestran en las Gráficas 6.1 y 6.2 respectivamente de las que podemos observar lo siguiente:

- 1) Ambos consorcios fueron capaces de degradar el MTBE, el consorcio *B* fue aparentemente mejor ya que degradó 91.6% del oxigenante inicial en 475 h, mientras que el consorcio *H* degradó 78.4% en el mismo tiempo.
- 2) Cabe mencionar que en estos experimentos no se determinó la cantidad de biomasa en cada microcosmos por lo que las velocidades máximas calculadas son volumétricas. El consorcio *B* mostró una velocidad máxima de degradación de MTBE alrededor del doble que el consorcio *H* (0.0005 vs. 0.0002 mg/mL·h). La velocidad del consorcio *B* se calculó mediante un análisis de regresión con el modelo de Gompertz, mientras que la cinética del consorcio *H* se ajustó mediante un análisis de regresión lineal.
- 3) El consumo de O₂ y la producción de CO₂ en ambos casos fueron bajos, probablemente a que no se mineralizó toda la molécula de MTBE.

Si se considera que el volumen de aire en el headspace de cada microcosmos, se comporta idealmente y que la presión atmosférica en la Cd. de México es aproximadamente 585 mm de Hg, entonces pudieron determinarse los porcentajes molares de CO₂ y de O₂ a través de mediciones en GC-TCD, y a partir de estos las concentraciones molares, que representan la respuesta respirométrica para ambos consorcios (Tabla 6.2).



Gráfica 6.1 Cinética de degradación de MTBE y respiración por el consorcio *B* en medio líquido. La $V_{\text{máx}}$ fue de 0.0005 mg/mL·h. ▲ MTBE, ◆ CO₂, ■ O₂.



Gráfica 6.2 Degradación de MTBE y evolución de la respiración por el consorcio *H* en medio líquido. La $V_{\text{máx}}$ fue de 0.0002 mg/mL·h. ▲ MTBE, ◆ CO₂, ■ O₂.

Tabla 6.2 Datos respirométricos de ambos consorcios degradadores de MTBE.

Consortorio	MTBE mg cons	mol CO ₂ /mol MTBE	CO ₂ (% del teórico)	mol O ₂ cons/mol MTBE	mol O ₂ teórico/mol MTBE ^a	mol O ₂ teórico/mol MTBE ^b
Consortio <i>B</i>	3.50	1.064	21.2	1.506	7.5	1.5
Consortio <i>H</i>	2.79	1.145	22.8	1.201	7.5	1.5
Consortio <i>F</i> ^c	10.31	2.565	58.2	4.771	7.5	1.5

a y b ver explicación en el texto

c: Como referencia se proporcionan los datos respirométricos del consorcio *F* bajo las mismas condiciones.

El dato indicado en la Tabla 6.2 como “mol O₂ teórico/mol MTBE (a)”, es la relación de oxígeno que se consumiría según la estequiometría de la reacción 6.1:



Que nos indicaría la completa mineralización del MTBE.

El dato indicado en la Tabla 6.2 como “mol O₂ teórico/mol MTBE (b)”, es la cantidad de oxígeno que se consumiría de acuerdo con la estequiometría de las reacciones 6.4 ó 6.7:



La reacción 6.2 muestra la transformación de la molécula de MTBE para formar TBA y formaldehído (Steffan *et al.* 1997). La reacción 6.5 se refiere a los casos en los que se ha observado formación de ácido fórmico (Hardison *et al.* 1997, Hyman *et al.* 1998) (ver Figura 3.1). Las reacciones 6.3 y 6.6 indican la oxidación a CO₂ y agua del formaldehído y del ácido fórmico respectivamente, es decir, si sólo se mineralizara el grupo metilo metoxi del metil-*tert* butil éter. En ambos casos la ecuación global es la misma (reacciones 6.4 y 6.7).

La Tabla 6.2 muestra que el consumo de O₂ por los consorcios *B* y *H* coincide con el valor teórico pronosticado según la ecuación 6.4 (ó 6.7). Este dato también coincide con el porcentaje de recuperación del carbono de MTBE (21-22%), es decir sólo se mineralizó uno de cada 5 átomos de carbono en la molécula de MTBE. Sin embargo, el TBA no pudo detectarse en el headspace de los microcosmos bajo las condiciones de medición en el cromatógrafo.

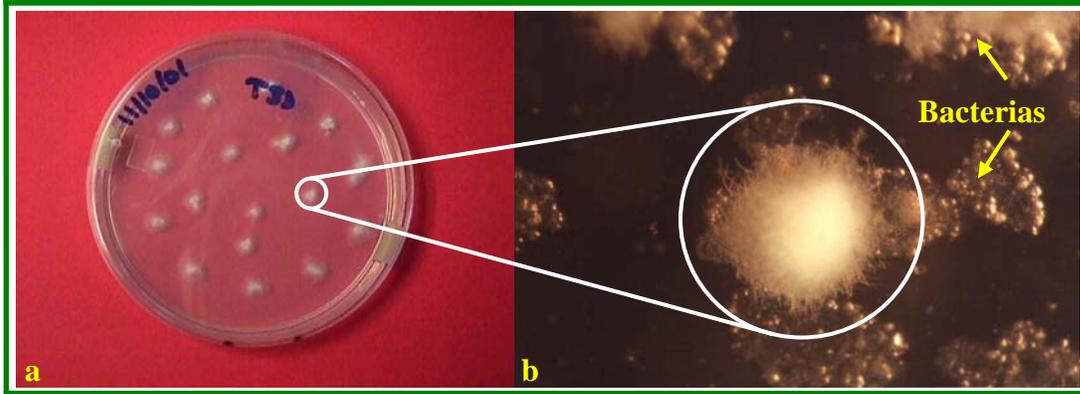


Figura 6.1 (a) Consorcio *H* en medio sólido. A simple vista crecieron colonias (5 mm) de un hongo. (b) al microscopio se observó que el hongo estaban rodeado por colonias de al menos una bacteria (Gram negativa).

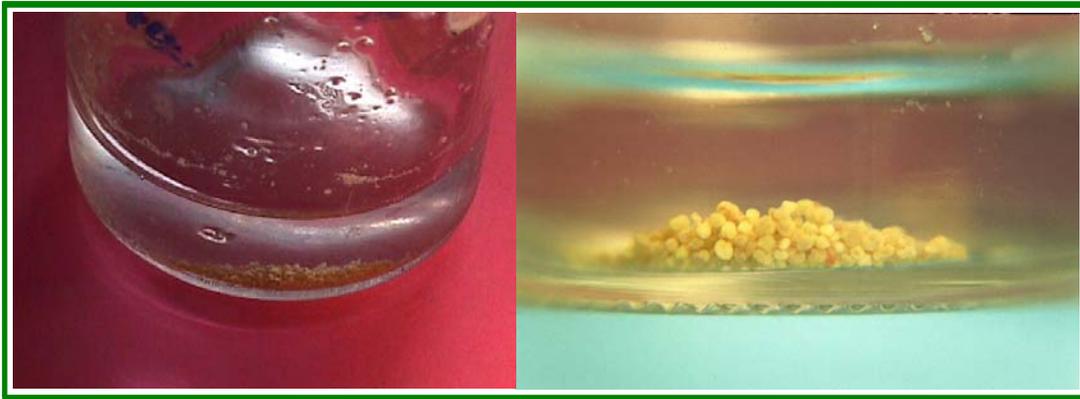


Figura 6.2 Formación de Gránulos por el consorcio *H* en medio líquido. Análisis de proteína del líquido mostró que toda la biomasa se encuentra en los gránulos.

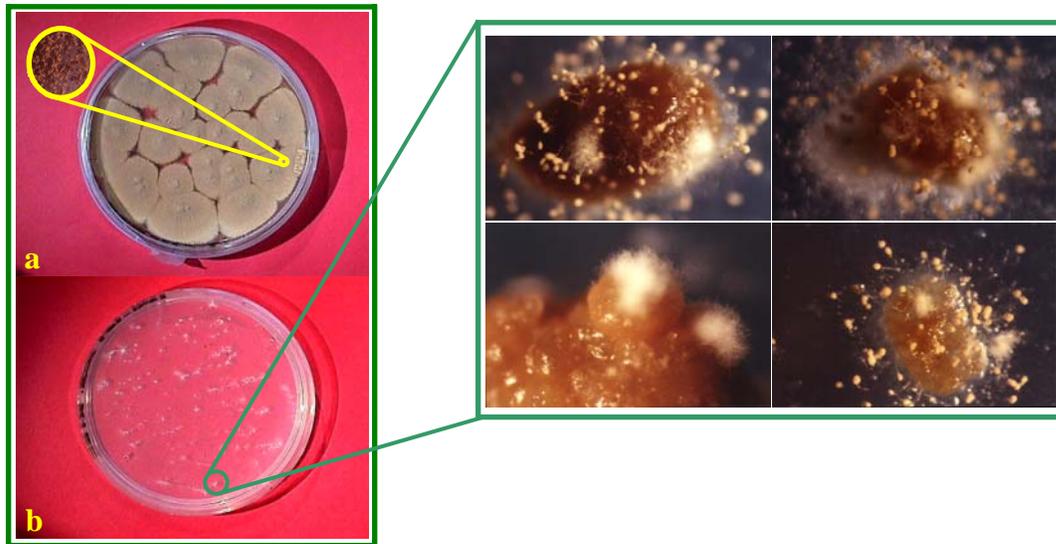


Figura 6.3 (a) *A. terreus* aislado en medio PDA. (b) gránulos del consorcio *H* sembrados en medio mineral en atmósfera de MTBE. Después de 1 mes creció el mismo hongo.

Algunos reportes como el de Steffan *et al.* (1997) señalan la capacidad de algunos cultivos de metabolizar el grupo metilo metoxi del MTBE. Ellos encontraron que cuando la cepa ENV425 crecida en propano se incubaba con MTBE se produjo TBA estequiométricamente y que durante la producción de TBA, aproximadamente 25% del carbono añadido se liberó como CO₂, presumiblemente resultado de la completa oxidación del grupo metil metoxi del MTBE. Sin embargo, a diferencia del presente trabajo, los autores encontraron una recuperación del 60% del MTBE añadido como CO₂, es decir, la oxidación posterior del TBA formado.

Por otro lado, el valor alcanzado por el consorcio *F* de referencia, está más cerca al valor teórico según la ecuación 6.1, lo que indica la posible mineralización de la molécula completa; la diferencia entre el valor experimental y el teórico puede deberse a la cantidad de sustrato utilizada para crecimiento.

Ninguno de los dos consorcios *B* o *H* pudo en esta etapa degradar TBA, TAME o ETBE (datos no mostrados).

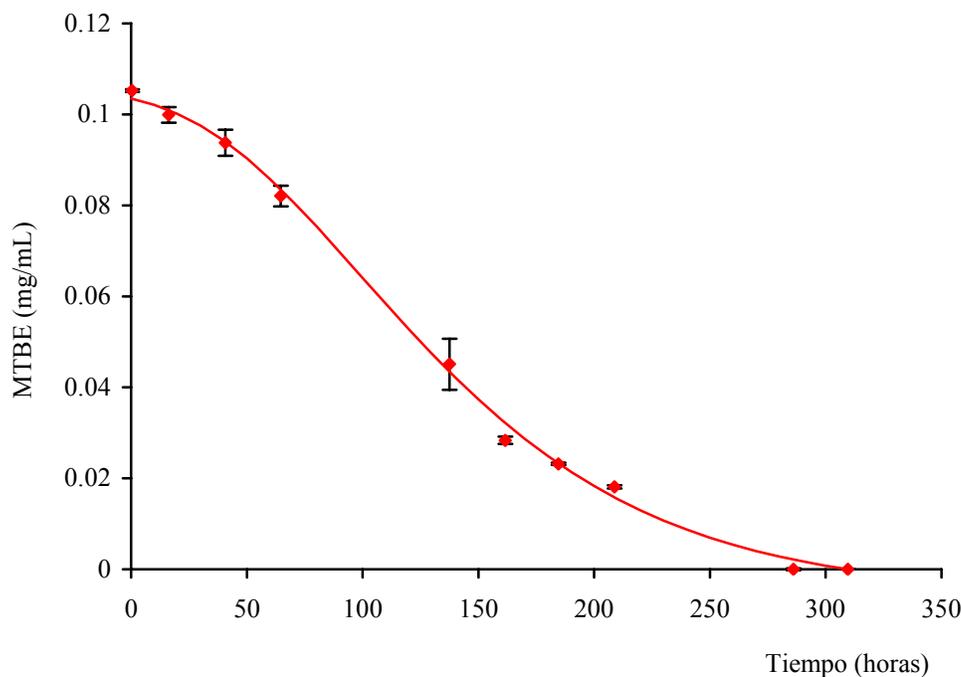
Conforme el cultivo *H* se acondicionó a crecer en MTBE, se observó la formación de pequeños gránulos, a diferencia de lo observado con cultivos bacterianos típicos que en medio líquido tienden a formar suspensiones homogéneas turbias. En este caso el medio de cultivo era muy claro (Figura 6.2).

6.1.3 Obtención de cultivos puros del consorcio *H*

Una vez que se comprobó que los cultivos mixtos *B* y *H* fueron capaces de degradar MTBE, se procedió a realizar el aislamiento de cepas fúngicas de ambos cultivos. Al observar muestras de gránulos al microscopio y mediante observaciones macroscópicas de colonias crecidas en placas Petri con medio PDA, se determinó que el cultivo *B* era básicamente bacteriano, no lográndose detectar ningún hongo. Por el contrario, a partir de un gránulo del consorcio *H* se aisló en medio PDA, un hongo filamentoso identificado preliminarmente como *Aspergillus terreus* (Figura 6.3a). Cuando se inocularon microcosmos con medio líquido YNB con micelio del hongo aislado, no se observó degradación de MTBE en un periodo de 2 semanas. No obstante, se observaron pequeñas colonias en medio sólido después de 1 mes de cultivo, cuando con gránulos crecidos en medio líquido YNB, se inocularon placas Petri con medio YNB en atmósfera de MTBE (Figura 6.3b), lo que indica que aparentemente el hongo si puede degradar MTBE pero crece muy lentamente en el mismo.

En ensayos posteriores, se estudió la capacidad de degradación de las esporas de *A. terreus* y de micelio germinado en glucosa. No se logró la degradación de MTBE en un periodo de un mes. La concentración inicial de MTBE fue de aproximadamente 180 mg/L. Se intentó además la inducción de la degradación de MTBE con micelio del hongo crecido en medio PDA mediante las adiciones periódicas del oxigenado, con la finalidad de no inhibir al hongo con una concentración elevada desde un inicio del cultivo. Se comenzó aproximadamente con 1-2 mg/L a las 48 h de cultivo y se efectuaron adiciones crecientes diarias durante una semana, hasta alcanzar 180 mg/L. Una vez lograda la concentración de trabajo, se determinó la capacidad de degradación. En un periodo de tres meses no se

observó degradación de MTBE. Esto puede deberse a dos causas: el hongo perdió su capacidad de degradación al ser aislado en un medio de cultivo rico, o nunca tuvo la capacidad de degradar al oxigenante como cultivo puro. Con el fin de estudiar el papel bacteriano en el consorcio, y debido a que no fue posible aislar de este cultivo ninguna bacteria en medio YNB en atmósfera de MTBE para su estudio directo, se decidió bajar el pH hasta 4.5 con el fin de favorecer el crecimiento del hongo sobre las bacterias presentes en los gránulos. En caso de que la acidez llegara a inhibir al cultivo, se separaron algunos gránulos y se mantuvieron en el medio habitual para conservarlos como reserva. La Gráfica 6.3 muestra la cinética de degradación de MTBE por el consorcio *H* a pH 4.5.



Gráfica 6.3 Degradación de MTBE por el consorcio *H* en medio líquido a pH 4.5.

Puede observarse que el MTBE fue degradado totalmente en 286 horas sin ninguna fase lag apreciable, de hecho la velocidad máxima de consumo (0.0006 mg/mL·h) fue el doble al cultivo a pH 5.5, que es el pH normal del medio YNB. Esto pudo deberse a que el cultivo estaba más adaptado al MTBE que cuando se realizaron las primeras cinéticas. En cualquier caso, esto muestra que la disminución de las bacterias al bajar el pH no afectó negativamente la capacidad de degradación del cultivo. Al observarse al microscopio muestras del líquido de cultivo, no se observaron bacterias. Las observaciones al microscopio electrónico revelaron en los gránulos unas estructuras filamentosas de varias micras (15-20 μm) de longitud (Figura 6.4), aunque también se observaron algunas estructuras redondas y alargadas más pequeñas ($< 1 \mu\text{m}$) que podrían asociarse con bacterias (Figura 6.4b y d). Esto indica que aunque se haya disminuido la población bacteriana, no desapareció por completo, por lo que como siguiente paso se decidió utilizar, además de pH bajo, antibióticos para eliminar definitivamente las bacterias que hubieran sobrevivido al tratamiento con ácido. Se utilizaron dos antibióticos: cloramfenicol y sulfato de gentamicina. El cloramfenicol es un antibiótico de amplio espectro que sin embargo no

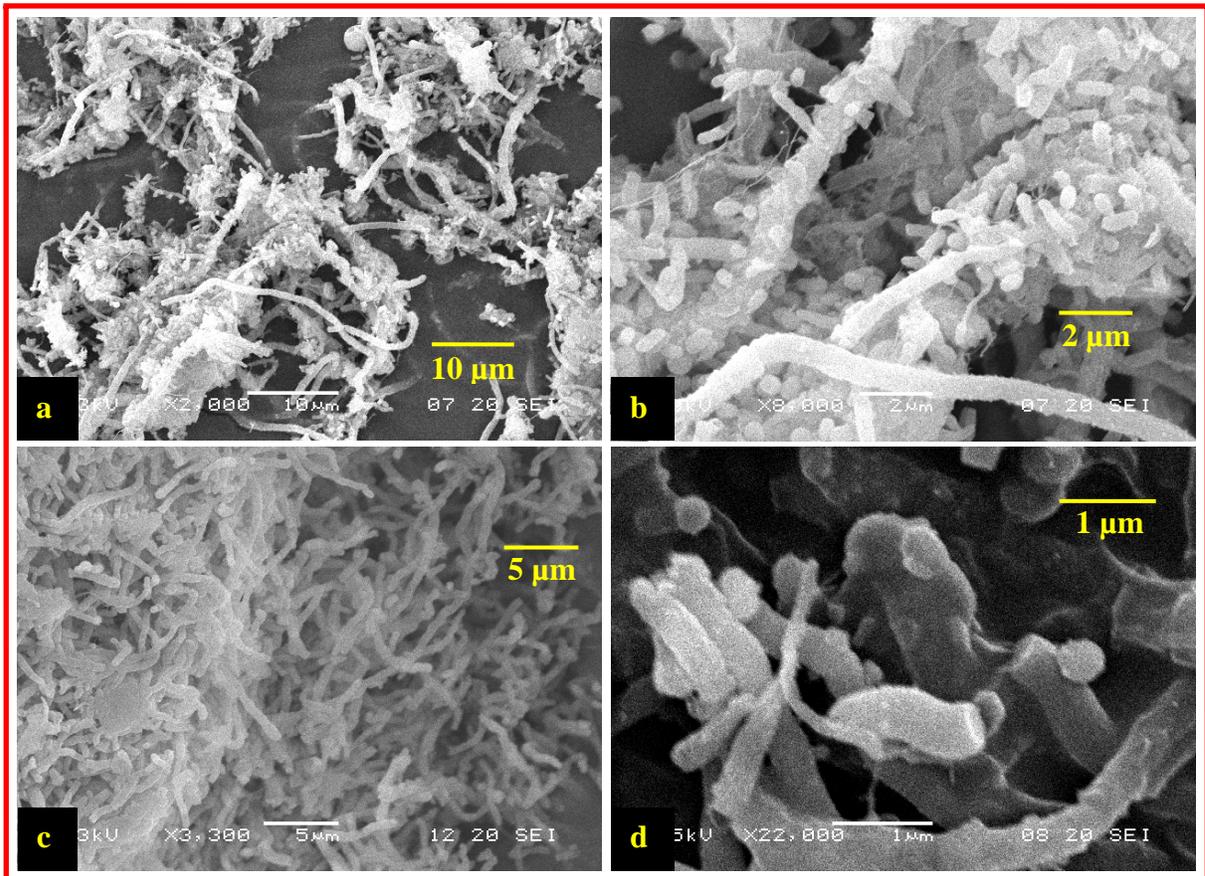


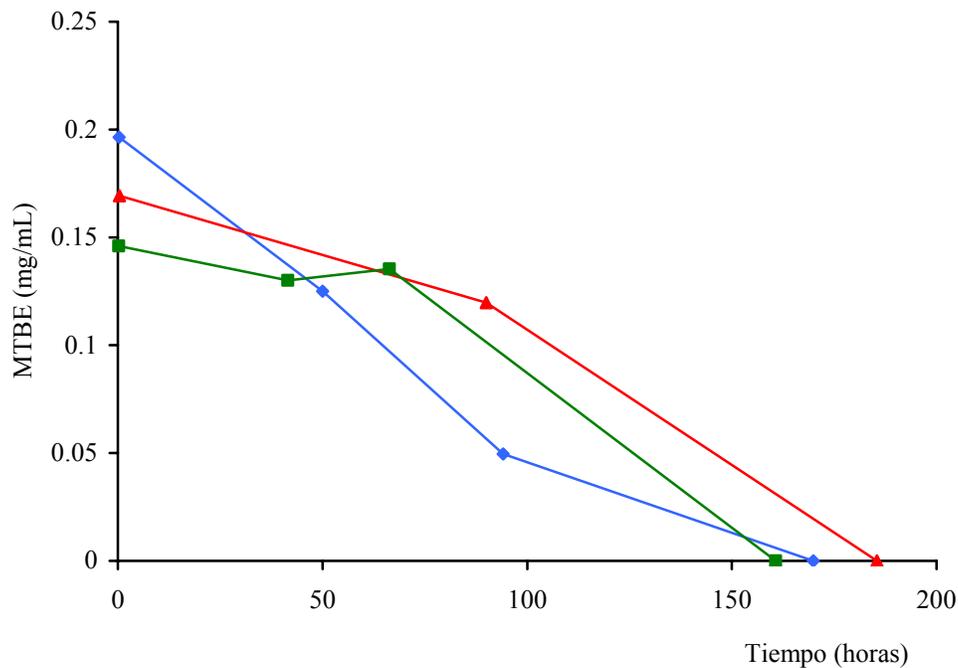
Figura 6.4 Micrografías electrónicas de gránulos del consorcio *H*. En a) y b) se observan estructuras filamentosas de aproximadamente 15-30 μm de longitud. En c) se aprecia que estas estructuras eran dominantes en la mayor parte de la superficie del gránulo. En b) y d) también se aprecian pequeñas formaciones de menos de 1 μm que podrían asociarse con bacterias.

ataca *Pseudomonas*, por lo que se optó por usar además gentamicina que si lo hace. La capacidad de degradación de MTBE de los gránulos del consorcio *H* con antibióticos y pH 4.5 cesó inmediatamente (datos no mostrados) y tampoco se observó consumo de oxígeno ni producción de CO₂ durante un periodo de casi un mes de cultivo. Este resultado parece indicar que la actividad de degradación era debida a las bacterias presentes y no al hongo, o bien que las bacterias y el hongo son requeridos juntos (simbiosis) para la degradación del MTBE, y que al faltar una especie, falla la ruptura del oxigenante. Aunque existe la posibilidad que el hongo fuera también afectado por los antibióticos.

6.1.4 Experimentos de degradación con los Consorcios adaptados *H* y *B*

6.1.4.1 Degradación de MTBE

Una vez acondicionado el cultivo *H* a degradar MTBE, se realizaron estudios cinéticos posteriores durante aproximadamente 5 meses para verificar que el cultivo mixto continuaba degradando el oxigenante, y se observaron algunos cambios en la capacidad de degradación. La Gráfica 6.4 muestra el resultado de las últimas tres cinéticas en el medio YNB y en la Tabla 6.3 se resumen los datos cinéticos y respirométricos de las 7 últimas cinéticas.



Gráfica 6.4 Cinéticas sucesivas de degradación de MTBE por el cultivo mixto *H* en medio líquido YNB después de un periodo de adaptación de cinco meses.

Al comparar los resultados de degradación de MTBE en medio YNB de la primer cinética con los de las últimas cinéticas 5 meses después (Gráficas 6.2 y 6.4), se observa que aumentó el porcentaje de degradación de 78.4% a más del 99% (el límite de detección del MTBE se estableció en 2.5 ppm), y el tiempo de cultivo se redujo de 475 horas a 175 h. En

estos casos los datos no se ajustaron y se determinaron las velocidades promedio de consumo La velocidad de degradación aumento de 0.0002 mg de MTBE/mL·h a 0012 mg/mL·h (Tabla 6.3).

Tabla 6.3 Datos cinéticos y respirométricos de degradación de MTBE por el consorcio *H*.

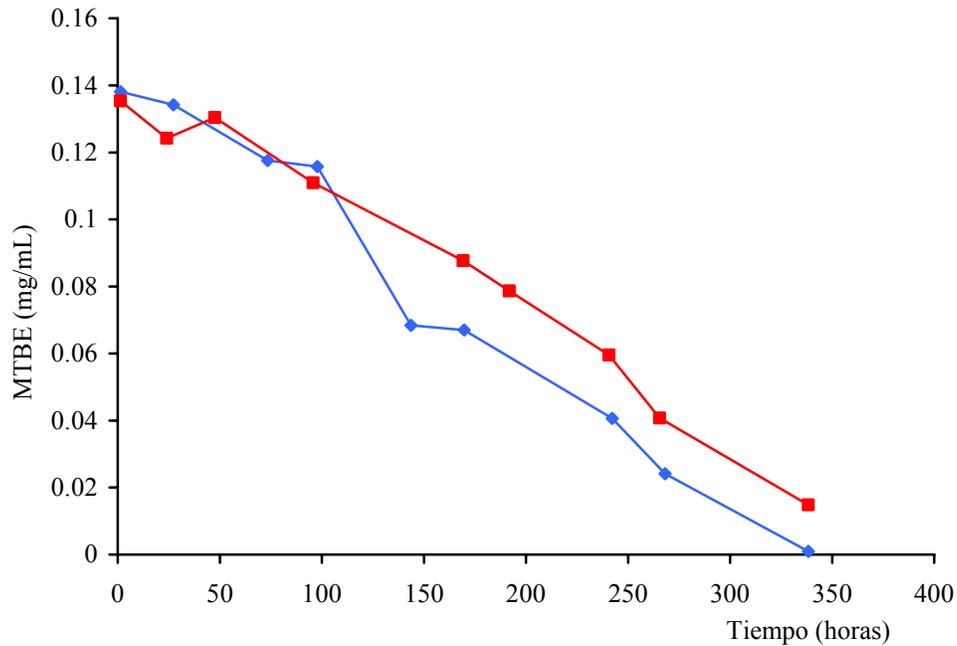
Cinética	MTBE mg cons	% Consumo	% O ₂ del teórico*	% CO ₂ del teórico*	V _{prom} mg/mL·h
1	5.46	>99.9	49.7	61.8	0.0019
2	4.19	>99.9	64.3	57.6	0.0018
3	4.91	>99.9	78.5	68.4	0.0006
4	3.98	>99.9	75.0	64.4	0.0011
5	4.87	>99.9	53.3	50.1	0.0012
6	4.20	>99.9	63.6	56.6	0.0009
7	3.62	>99.9	65.9	59.0	0.0009
		Promedio	64.3	59.7	0.0012

* Teórico: Oxidación completa

El porcentaje de recuperación de carbono como CO₂ aumentó del 22.8% a cerca del 60% y el consumo de O₂ promedio fue del 64% con respecto al teórico, lo que nos indica que el cultivo desarrolló la capacidad de metabolizar más que el grupo metilo del MTBE. La formación de TBA se detectó de forma transitoria, y no se acumuló. Prácticamente no se encontraron carbonatos en el medio líquido. Estos datos a diferencia de los obtenidos durante el enriquecimiento del cultivo, ahora coinciden con los reportados por Steffan *et al.* (1997), quienes también recuperaron 60% del MTBE como CO₂ y el TBA se acumuló transitoriamente. Estos resultados se deben por una parte al incremento de la biomasa y por otro a la mejor adaptación del cultivo mixto; probablemente a un cambio poblacional del mismo (crecimiento preferencial de una especie sobre otras).

En la Gráfica 6.5 se observan las dos últimas cinéticas de degradación de MTBE por el consorcio *B* después del periodo de adaptación de 5 meses. Los últimos experimentos con el consorcio *B*, también muestran cambios en la degradación del oxigenante. El porcentaje de degradación se mantuvo más o menos constante de 92% en 475 horas a 94% en 360 horas. La velocidad promedio de degradación también se mantuvo casi constante, de 0.0005 mg/mL·h hasta 0.0004 mg/mL·h (Tabla 6.4). Debe señalarse sin embargo, que en la primera cinética se observó una fase lag de alrededor de 50 horas, en cambio en las últimas cinéticas la degradación inició de manera lineal desde el tiempo cero. Estos hechos dan indicio de una mejor adaptación del cultivo.

Al final de las últimas cinéticas, los gránulos cultivados en ambos medios (YNB y BH) mostraron un aspecto similar tanto en color como en tamaño. Sin embargo, puesto que las observaciones al microscopio y la propagación en medio mineral y en medio rico mostró que el cultivo *B* era básicamente bacteriano, no se profundizó más en su estudio, por no ser las bacterias el objetivo principal de esta Tesis.



Gráfica 6.5 Últimas dos cinéticas de degradación de MTBE por el cultivo mixto *B* en medio líquido.
 ◆ Cinética 1, ■ Cinética 2.

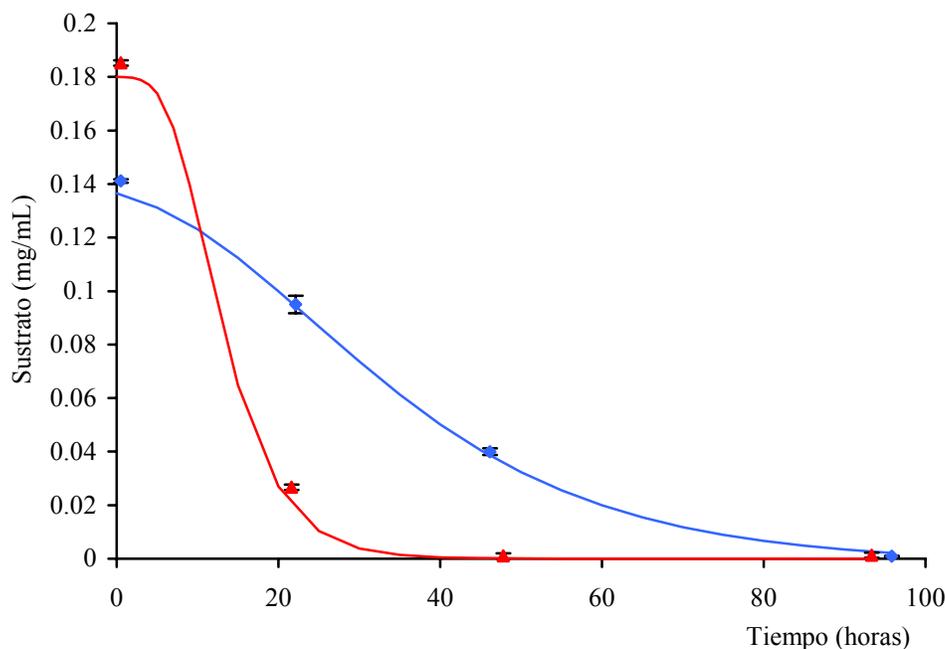
Tabla 6.4 Datos cinéticos y respirométricos de degradación de MTBE por el consorcio *B*.

Cinética	MTBE mg cons	% Consumo	% O ₂ del teórico*	% CO ₂ del teórico*	V _{prom} mg/mL·h
1	1.37	99.3	85.10	77.1	0.00044
2	1.21	89.1	80.97	74.8	0.00036
	Promedio	94.2	83.03	76.0	0.00040

* Teórico: Oxidación completa

6.1.4.2 Degradación de TBA

Para los experimentos posteriores de degradación de otros oxigenantes por el cultivo *H*, se decidió dividir la biomasa del microcosmos con medio YNB en dos partes para formar dos microcosmos en frascos serológicos más pequeños de 60 mL conteniendo 10 mL de medio. Uno de los microcosmos continuó alimentándose con MTBE para servir como cultivo de referencia. El segundo frasco fue alimentado con TBA. En la Gráfica 6.6 se muestran las cinéticas de degradación de MTBE y TBA.



Gráfica 6.6 Degradación de TBA por el cultivo mixto *H* en medio líquido. Degradación de MTBE como referencia. ▲ TBA, ◆ MTBE.

A diferencia de los primeros experimentos en la fase de enriquecimiento del cultivo, se confirmó que el cultivo fue capaz de degradar TBA, a una velocidad máxima de 0.0133 mg/mL·h. El cultivo de referencia con MTBE degradó el sustrato a una velocidad promedio de 0.0026 mg/mL·h. A diferencia de los datos reportados por Hyman *et al.* (1998) se observa que la velocidad de degradación de TBA es mayor que la del MTBE y puesto que la degradación de ambos compuestos se realizó sin fase lag, es posible que una enzima común sea responsable de la degradación de ambos compuestos. Liu *et al.* (2001) encontraron que una misma enzima es responsable tanto de la degradación cometabólica de MTBE como de TBA en *Arthrobacter* (ATCC 27778). En este trabajo ambos sustratos fueron consumidos por encima del 99%. El porcentaje de recuperación de carbono como CO₂ para el TBA fue de 77.2% y de 77.3% para el MTBE. Estos últimos datos muestran que el cultivo está mucho mejor adaptado que con respecto a los primeros experimentos y el MTBE podría servir como sustrato de crecimiento y que la ruptura del enlace éter probablemente es el paso limitante de su degradación.

6.1.4.3 Degradación de ETBE y TAME

También se estudió la degradación de ETBE y TAME. Luego, en cinéticas posteriores, con el fin de favorecer el crecimiento del hongo sobre las bacterias e investigar el efecto de su inhibición en la degradación de los oxigenantes, a los microcosmos se les añadió gentamicina. La Gráfica 6.7 muestra los resultados obtenidos.

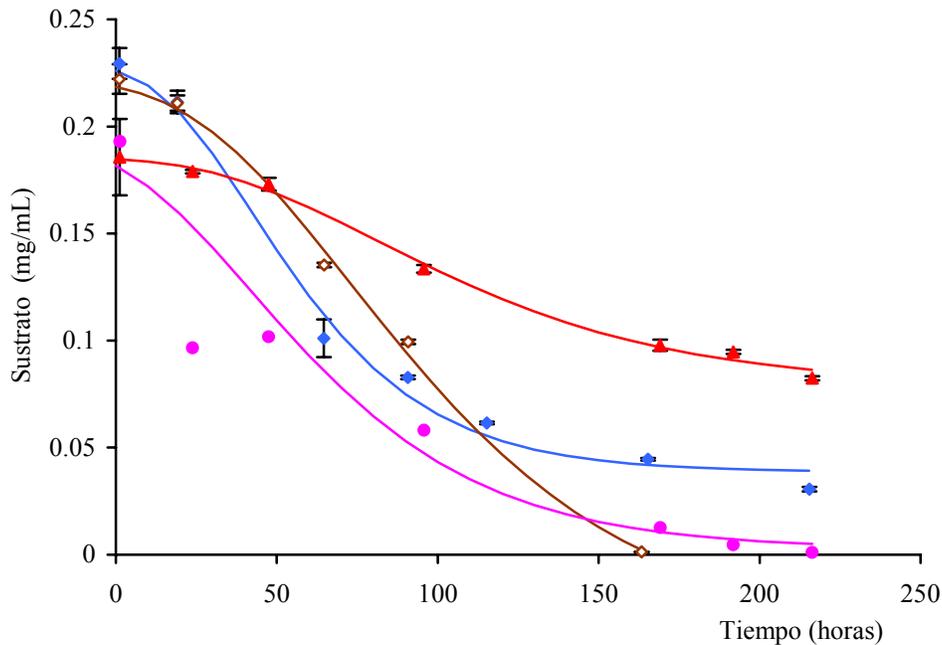


Gráfico 6.7 Degradación de ETBE y TAME por el cultivo *H* en medio líquido con y sin antibiótico.
 ◆ ETBE, ▲ ETBE con antibiótico, ◇ TAME, ● TAME con antibiótico.

Ambos oxigenantes fueron consumidos por los cultivos a diferencia de los experimentos de enriquecimiento. El ETBE se degradó a una velocidad promedio de 0.0023 mg/mL·h. El consumo fue de 86.6% en 216 h. La recuperación de carbono como CO₂ fue del 67.8%. La cinética de TAME mostró una degradación superior al 99% en 163 horas, con una velocidad promedio de 0.0019 mg/mL·h y una recuperación de carbono de 65.8%. En el caso del ETBE con antibiótico, se observó una disminución en la velocidad de degradación a 0.0008 mg/mL·h. También disminuyó la degradación al 55.6% y el porcentaje de recuperación (58.35%). El experimento de degradación de TAME con antibiótico también mostró degradación superior al 99% pero en 216 h. La velocidad promedio de degradación disminuyó ligeramente a 0.0017 mg/mL·h. Sin embargo la recuperación de carbono aumentó a 76.5%. Este dato aporta evidencia de que la degradación de los oxigenados es debida principalmente a un hongo filamentoso. Ya que la degradación de ambos compuestos se realizó sin fase lag puede pensarse que son degradados por la misma enzima que el MTBE y el TBA.

6.1.5 Conclusiones parciales con el consorcio *H*

- 1) Después de un periodo de enriquecimiento, se obtuvo un consorcio predominantemente fúngico (*H*) compuesto por el hongo *A. terreus* y al menos una bacteria capaz de degradar MTBE (0.0026 mg/mL·h), TAME (0.0019 mg/mL·h) y ETBE (0.0023 mg/mL·h) en cultivos líquidos con acumulación transitoria de TBA.

- 2) Los datos de respirometría muestran que el consorcio utilizó los sustratos de crecimiento.
- 3) La velocidad de degradación del TBA (0.0133 mg/mL·h) fue mayor que la velocidad de degradación de MTBE (0.0026 mg/mL·h) lo que indica que el rompimiento del enlace éter es el paso limitante en la degradación de MTBE.
- 4) El rendimiento celular con MTBE fue muy bajo (no detectable).
- 5) La enzima responsable de la oxidación inicial del MTBE fue inducible por la presencia del propio oxigenante.
- 6) Puesto que la degradación de TBA, TAME y ETBE por el cultivo enriquecido en MTBE procedió sin una fase lag apreciable, es posible que la enzima responsable de la oxidación de estos compuestos sea la misma.
- 7) Los experimentos con antibióticos aportan evidencia que la degradación de los oxigenantes es debida principalmente al hongo *A. terreus*.

6.2 El consorcio *UAMI* y el consorcio *F*

Después de un periodo aproximado de tres meses de enriquecimiento en medio líquido, a partir de muestras de un biofiltro degradador de pentano y MTBE por cometabolismo, mencionadas en la sección 5.2.1 d, se logró un cultivo mixto (*UAMI*) en forma de “gránulos” (Figura 6.5) capaz de degradar MTBE como única fuente de carbono y energía. Este cultivo se comparó con un cultivo de referencia obtenido en la Universidad de California, Riverside: el consorcio *F* (ver sección 5.2.1 e).

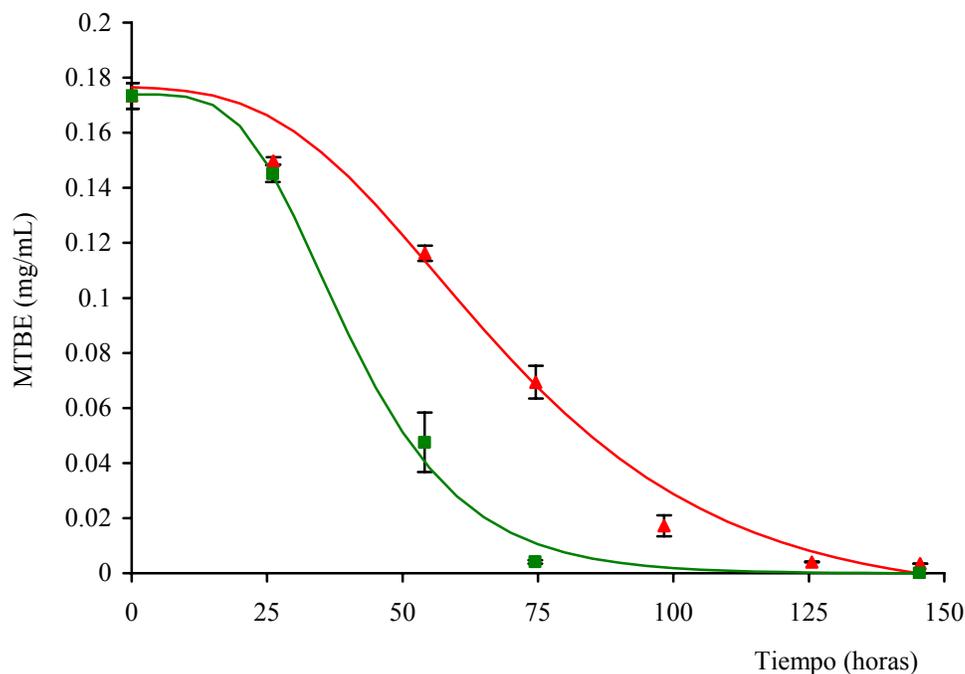
6.2.1 Adaptación y evaluación de la capacidad degradativa del consorcio *UAMI* y del consorcio *F*

Las primeras cinéticas de degradación de MTBE se muestran en la Gráfica 6.8. Se observa que los dos consorcios: *UAMI* y el cultivo de referencia *F* pudieron consumir MTBE, logrando el 100% de degradación de la masa inicial de MTBE en alrededor de 145 horas.

Ambos cultivos lograron la mineralización del MTBE en más del 60% (Tabla 6.5). Sin embargo, el consumo de oxígeno fue mayor al 100% con respecto al valor teórico esperado para la completa mineralización de la molécula (probablemente debido a respiración endógena). La velocidad máxima de degradación del consorcio *F* fue de 0.0043 mg/mL·h y para *UAMI* de 0.0023 mg/mL·h.

Una vez que se comprobó que los cultivos podían degradar MTBE, se estudió la degradación de otros oxigenantes: TBA, ETBE y TAME. Al realizar el cambio de medio mineral para realizar la cinética con ETBE, se observó que el consorcio *F* comenzó a lisarse. Se realizó una cinética más de degradación de MTBE con este consorcio pero

perdió por completo la capacidad de degradación. Tampoco se observó producción de bióxido de carbono ni consumo de oxígeno.



Gráfica 6.8 Cinéticas de degradación de MTBE por los consorcios *UAMI* ▲ y *F* ■ en medio líquido.

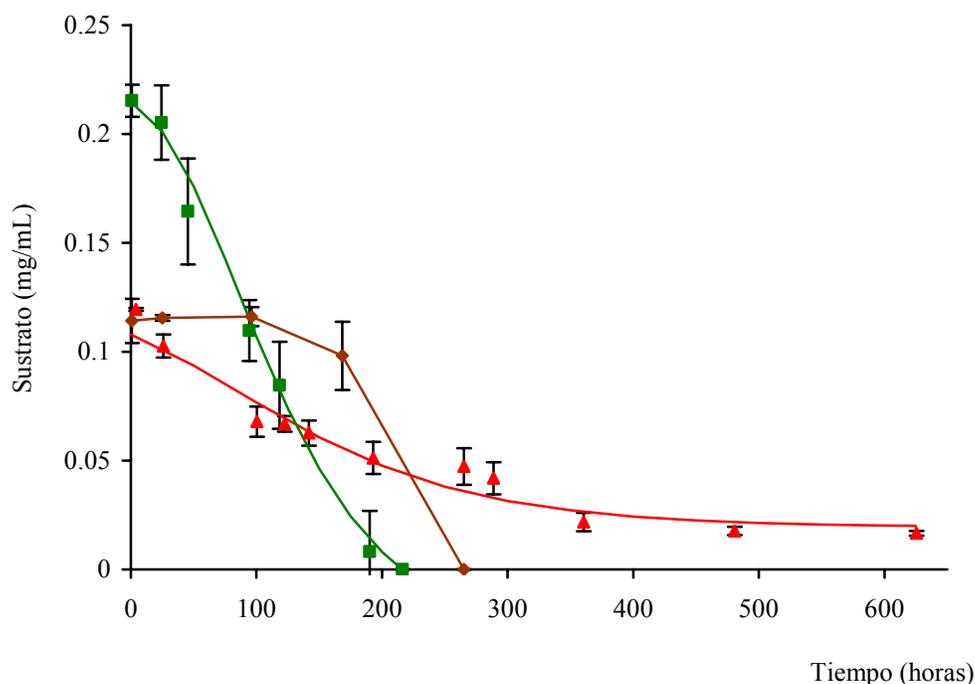
La Gráfica 6.9 muestra la degradación de TBA, TAME y ETBE por el consorcio *UAMI*. El consorcio *UAMI* consumió 86% del ETBE inicial; a partir de las 350 horas de cultivo cesó el consumo de ETBE, sin embargo se logró la completa mineralización del sustrato consumido (Tabla 6.5). En comparación con la cinética de MTBE, se observa que el cultivo no emplea prácticamente nada de ETBE para formación de biomasa.

Tabla 6.5 Resumen de datos respirométricos y de degradación de oxigenantes de gasolina.

Sustrato	Cultivo	Conc. inicial mg/mL	% consumo	Tiempo (h)	Vel. máx mg/mL·h	O ₂ % del teórico*	CO ₂ % del teórico*
MTBE	<i>F</i>	0.17	>99.9	145	0.0043	100	61
MTBE	<i>UAMI</i>	0.17	>99.9	145	0.0023	137	61
ETBE	<i>UAMI</i>	0.12	86	625	0.0003	109	100
TAME	<i>UAMI</i>	0.11	>99.9	265	0.0010**	76	69
TBA	<i>UAMI</i>	0.29	>99.9	215	0.0014	37	33

* Teórico: Oxidación completa

**No se pudo ajustar por Gompertz, la velocidad máxima de consumo se obtuvo calculando la pendiente de los últimos puntos.



Gráfica 6.9 Cinéticas de degradación de TBA, TAME y ETBE por el consorcio *UAMI*. El Consorcio *F* fue atacado por protozoarios y perdió su capacidad degradadora. ▲ ETBE, ◆ TAME, ■ TBA.

Una explicación al hecho de que el ETBE no se consumiera totalmente es que éste no fuera un inductor de la enzima responsable de su ruptura inicial y que, al no estar presente el MTBE (el inductor), la enzima tendería a desaparecer y la degradación del ETBE eventualmente cesaría. La ruptura del ETBE genera una molécula de TBA y una de acetaldehído (o acetato). En experimentos posteriores de degradación de TBA se observó que éste sí se consumió totalmente (ver datos más adelante) y sólo se mineraliza en un 33% lo que indica que parte de la molécula se incorpora como biomasa. Una posible explicación a la observación de la completa mineralización de la fracción consumida del ETBE sería un error en los datos experimentales de CO_2 , esto es, que el porcentaje de mineralización fuera en realidad menor al 100% y que sí exista algo de asimilación del sustrato.

A diferencia de las cinéticas con ETBE y TBA que comenzaron inmediatamente, la cinética de degradación de TAME mostró una fase lag de aproximadamente 100 horas. Este dato sugiere que la enzima que rompe la molécula de MTBE podría ser diferente a la que rompe la molécula de TAME, la cual requirió un tiempo para su inducción o quizás el proceso de cambio de medio de cultivo y el enjuague con solución salina previó a los experimentos, “lavó” la enzima responsable de su degradación y el cultivo tuvo que sintetizarla nuevamente. El consorcio *UAMI* agotó todo el TAME en 250 horas lográndose alrededor del 70% de conversión del sustrato a bióxido de carbono. Una vez que el cultivo degradó TAME, su velocidad máxima de consumo fue similar a la del TBA ($0.001 \text{ mg/mL}\cdot\text{h}$). Estos datos no pudieron ajustarse mediante el modelo de Gompertz y la velocidad máxima de degradación se obtuvo mediante regresión lineal de los últimos puntos.

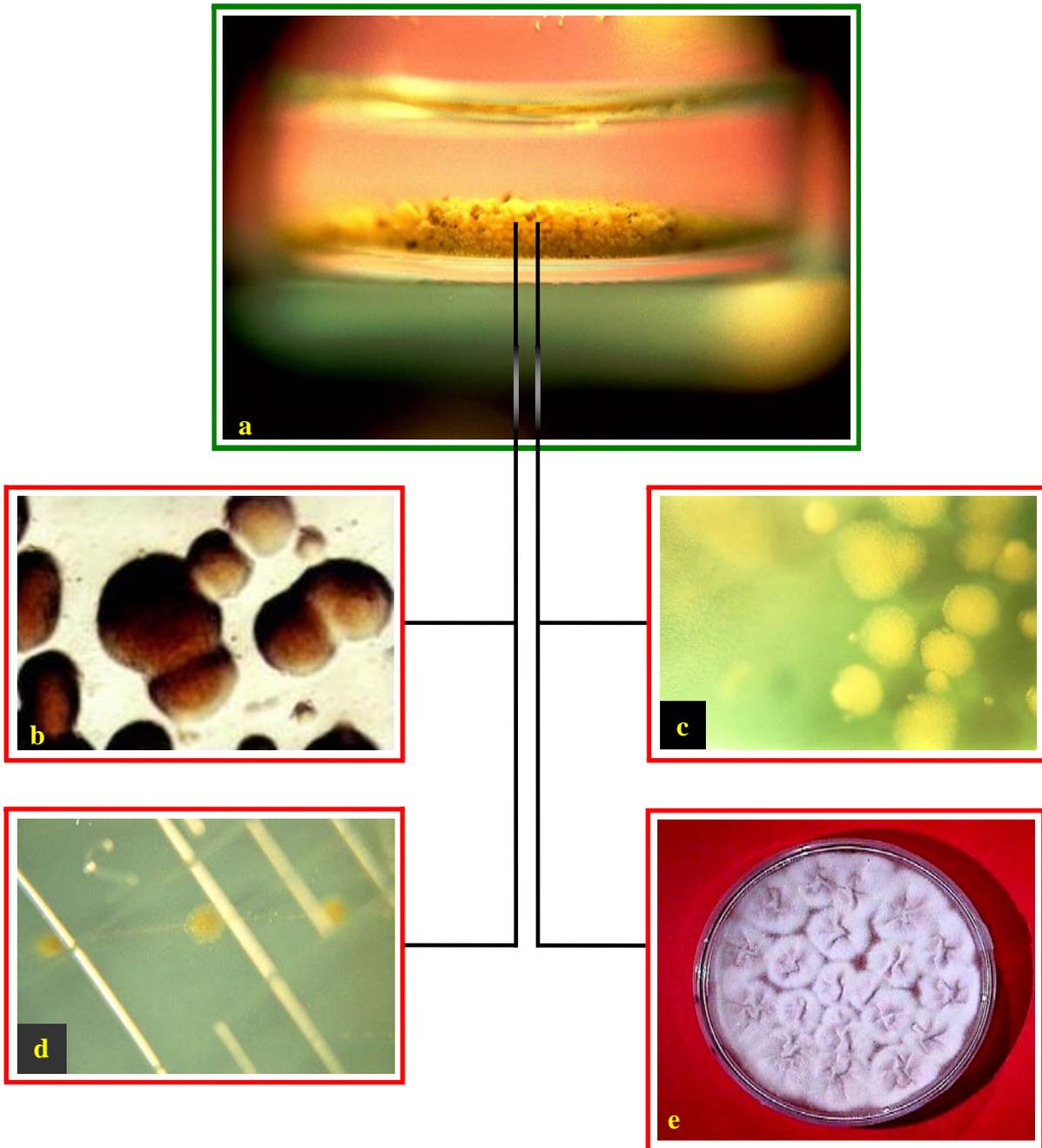


Figura 6.5 (a) Consorcio *UAMI* en medio líquido: formación de gránulos después de tres meses de enriquecimiento. De este cultivo se aislaron en medio rico tres diferentes bacterias (b, c y d) y un hongo rosa (e).

Se observó que el cultivo era capaz de degradar todo el TBA en 215 horas, lográndose un 33% de recuperación del compuesto como bióxido de carbono y una velocidad máxima de degradación de 0.001 mg/mL·h. Para poder detectar el TBA por GC-FID, se modificó la atenuación y el rango del cromatógrafo con respecto a los primeros experimentos con los consorcios *B* y *H* (ver sección 6.1.2) y en los microcosmos se alimentó un volumen de TBA mayor (mayor concentración) que de los otros oxigenantes. Para el consorcio *UAMI*, el sustrato más difícil de degradar fue el ETBE (a una velocidad promedio de 0.0003 mg/mL·h) y el más fácil el MTBE (0.002 mg/mL·h), es decir más de seis veces más rápido.

En esta etapa, los datos de degradación de TBA coinciden con lo reportado por Hyman & O'Reilly 1999). Los autores encontraron que *Xanthobacter* degrada TBA más lentamente que MTBE y al parecer con la misma enzima que degrada MTBE.

6.2.2 Aislamiento de microorganismos del consorcio *UAMI*

Con la finalidad de aislar cepas individuales del consorcio *UAMI*, se sembraron gránulos tanto en medio mineral YNB en atmósfera de MTBE como en medio rico (Agar bacteriológico y PDA). A partir de las placas con medio rico fue posible aislar 3 grupos bacterianos con morfología diferente (B1, B2 y B3). Además se aisló un hongo color rosa (Figura 6.5b-e). En las placas con medio YNB no creció ninguna colonia bacteriana, solamente pequeñas colonias del hongo que al resembrar en medio PDA se comprobó que se trataba del hongo rosado.

Se estudió la capacidad de degradación de MTBE por esas cepas en medio líquido. Para evitar una posible inhibición de las cepas con el MTBE, se decidió disminuir la concentración inicial a alrededor de 0.03 mg/mL. Se probaron suspensiones de las cepas bacterianas individuales y en mezcla a una densidad óptica de aproximadamente 0.13 a 600 nm de cada cepa. Ninguna de las cepas bacterianas individuales ni en mezcla logró degradar MTBE en un periodo de 15 días. Tampoco se observó consumo de oxígeno ni formación de CO₂.

Una vez que las colonias del hongo cultivadas en medio mineral YNB alcanzaron un tamaño mínimo de 1 mm de diámetro, se hicieron experimentos con los hongos y con mezclas del hongo y las bacterias, del modo siguiente:

- Cultivos del hongo crecido en medio rico PDA (con antibióticos)
- Cultivos del hongo crecido en PDA con cada una de las tres bacterias y con la mezcla de las tres.
- Cultivos del hongo crecido en medio YNB (con antibióticos).
- Cultivos del hongo crecido en YNB con cada una de las tres bacterias y con la mezcla de las tres.

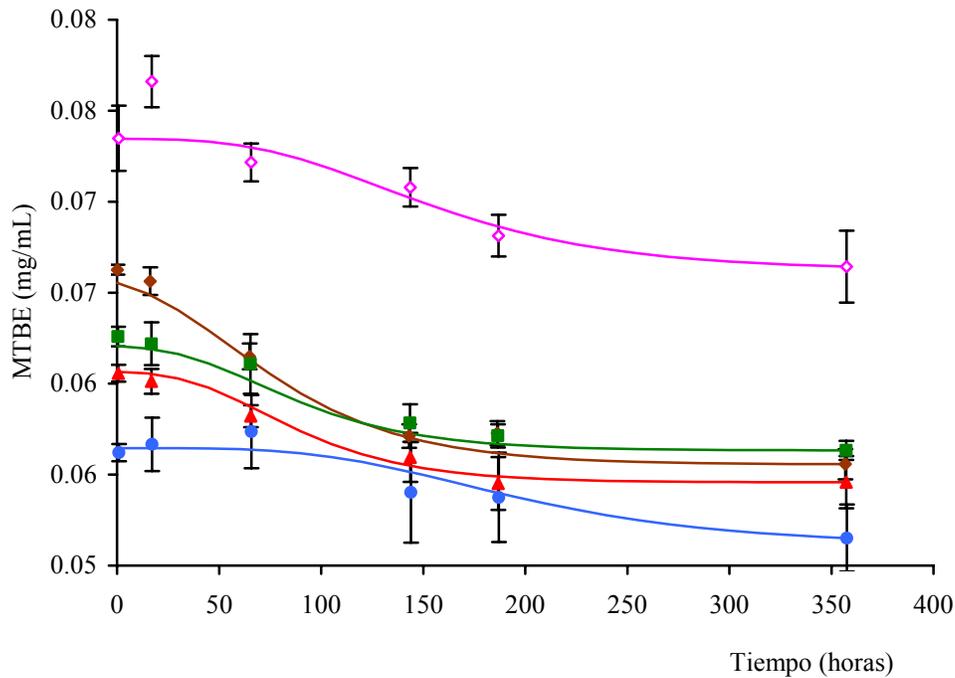
A diferencia de las bacterias que tuvieron que cultivarse en medio rico para poder aislarlas, el hongo aislado en medio YNB siempre estuvo en contacto y adaptado a degradar MTBE a una concentración de 0.18 mg/mL en placas de Petri con atmósferas

controladas del oxigenante por lo que para estos experimentos se decidió incrementar la concentración en el medio líquido al doble que la anterior (0.06 mg/mL).

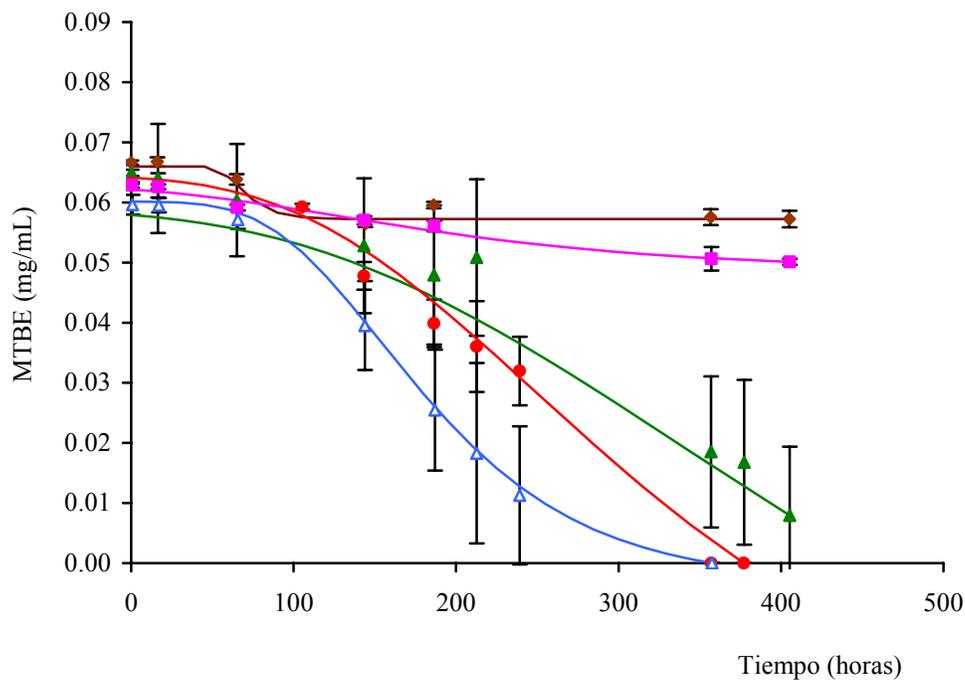
En los microcosmos con el hongo crecido en medio rico sólo se degradó un 15% del MTBE inicial y a partir de las 185 horas la concentración permaneció constante (Gráfica 6.10). Una tendencia similar se observó en las mezclas del hongo con las diferentes bacterias; en general el MTBE disminuyó en un 10%. Se consideró poco probable que estos cultivos degradaran MTBE ya que el Coeficiente de Variación (C.V. = 6%) fue similar al de los cultivos bacterianos donde no hubo consumo (C.V. = 5-6%). Un dato interesante es que a diferencia de los cultivos de bacterias que no produjeron CO₂ ni consumieron O₂, en los cultivos con el hongo solo y con mezclas sí se observó respiración incluso en una cantidad mayor (hasta un orden de magnitud mayor) que la cantidad teórica esperada de la mineralización del sustrato que desapareció en cada caso (datos no mostrados). Esto podría explicarse si se hubiera arrastrado algo del medio rico al re-inocular las colonias del hongo crecidas en medio PDA o por la acumulación de reservas que pudieran reprimir el consumo de MTBE. En la Gráfica 6.11 se muestran los resultados alcanzados con el hongo crecido en medio mineral (YNB). Se observa que en el cultivo del hongo solo, adicionado con antibióticos, degradó el 13% del MTBE inicial y con el cultivo del hongo junto con la cepa B3 el 19%. En estos casos, el C.V. de estos dos cultivos fue de 9% y 8.7% respectivamente, es decir, se observa una variación mayor de los datos que en los cultivos sin consumo, lo que quizás significa que estos dos cultivos sí degradan MTBE pero en un tiempo de cultivo mucho más largo. Sí se observó una clara degradación en las mezclas del hongo con la cepa B1, con la cepa B2 y con la mezcla de las tres bacterias. La mezcla del hongo con la cepa B1 degradó 86% del MTBE en 405 h a una velocidad máxima de 0.17 mg/L·h. Los cultivos del hongo con la bacteria B2 y con la mezcla de bacterias degradaron todo el MTBE a las 357 horas de cultivo a velocidades máximas de 0.24 mg/L·h y de 0.33 mg/L·h respectivamente. Puesto que las bacterias solas o en mezcla fueron incapaces de degradar MTBE, los datos anteriores parecen sugerir que la actividad de degradación es debida a la unión del hongo y al menos una bacteria, esto es, que se requeriría de la asociación simbiótica de al menos dos microorganismos diferentes (un hongo y una bacteria) para romper la molécula del MTBE.

6.2.3 Identificación de las bacterias del consorcio *UAMI*

Con el fin de identificar las tres cepas aisladas del consorcio *UAMI*, se emplearon técnicas de biología molecular. Se utilizó el protocolo de aislamiento de ADN Wizard Genomic DNA Purification Kit de Promega Corporation. Posteriormente se hizo la amplificación del ADN que codifica para el ARN 16s, un fragmento de 1.5 kpb (PCR) utilizando dos pares de primers: Fd1/RG y Fd1/Rd1, determinándose mediante un perfil de bandas en un gel de agarosa, que el uso del segundo par de primers Fd1/Rd1, era el más conveniente. Posteriormente se hizo la clonación del fragmento amplificado en una cepa de *E. coli* JM109, seleccionándose las cepas que presentaran resistencia al antibiótico ampicilina y que no mostraran actividad de la enzima β galactosidasa (colonias blancas). Las colonias adecuadas, se utilizaron para secuenciar el fragmento clonado que codifica para ARN 16s y compararlo con un banco de datos de secuencias de bacterias conocidas. En la Figura 6.6 se presenta el árbol filogenético donde se colocaron



Gráfica 6.10 Degradación de MTBE por un hongo aislado del consorcio *UAMI* en medio PDA, solo y en mezcla con las bacterias aisladas del mismo consorcio. ◆ Hongo, ■ Hongo-B1, ▲ Hongo-B2, ◇ Hongo-B3, ● Hongo-Mezcla.



Gráfica 6.11 Degradación de MTBE por el hongo aislado del consorcio *UAMI* en medio YNB, solo y en mezcla con las bacterias aisladas del mismo consorcio. ◆ Hongo, ▲ Hongo-B1, ● Hongo-B2, ■ Hongo-B3, △ Hongo-Mezcla.

las secuencias de las bacterias estudiadas. Cuando se compararon las secuencias del gen que codifica para el ARN 16s, se observó que los clones de la bacteria B1 no correspondían a alguna bacteria conocida. Los clones de la bacteria B2, corresponden a *Bacillus cereus*. Los clones de la cepa B3 son idénticas en secuencia a *Bacillus simplex* y *Bacillus megaterium*. El hongo no se pudo identificar.

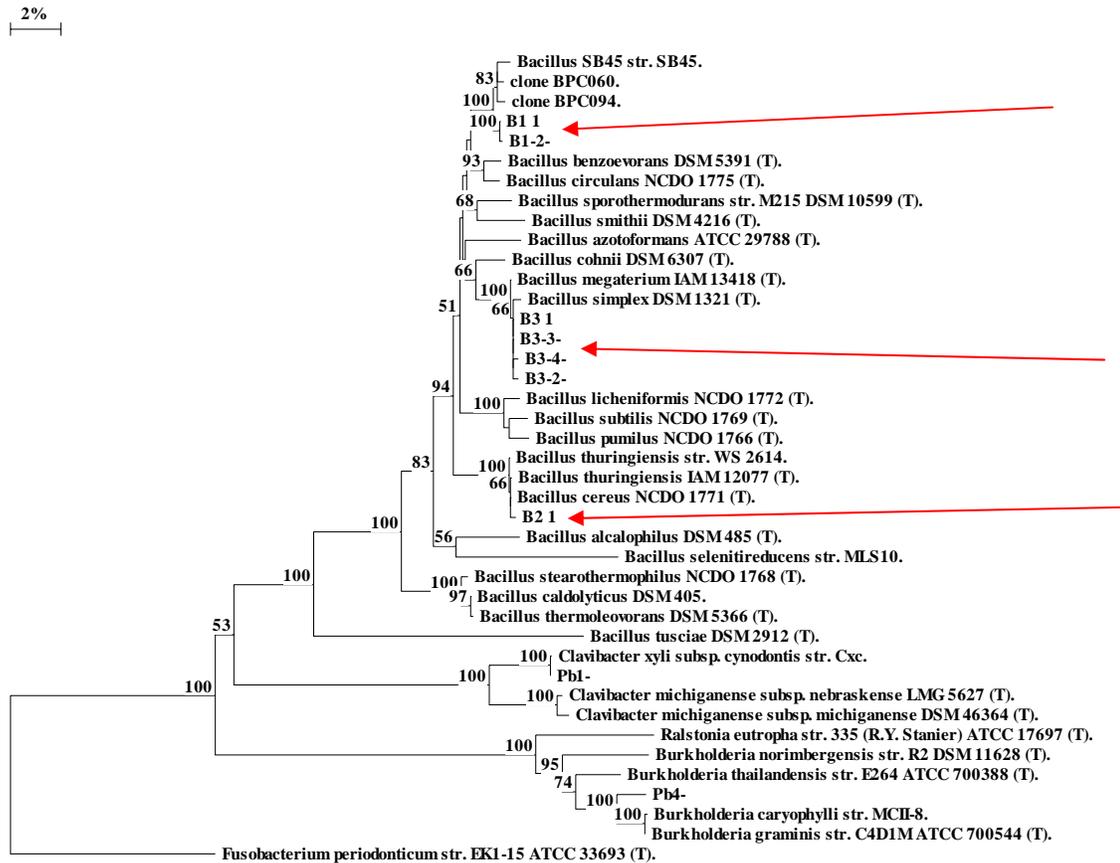
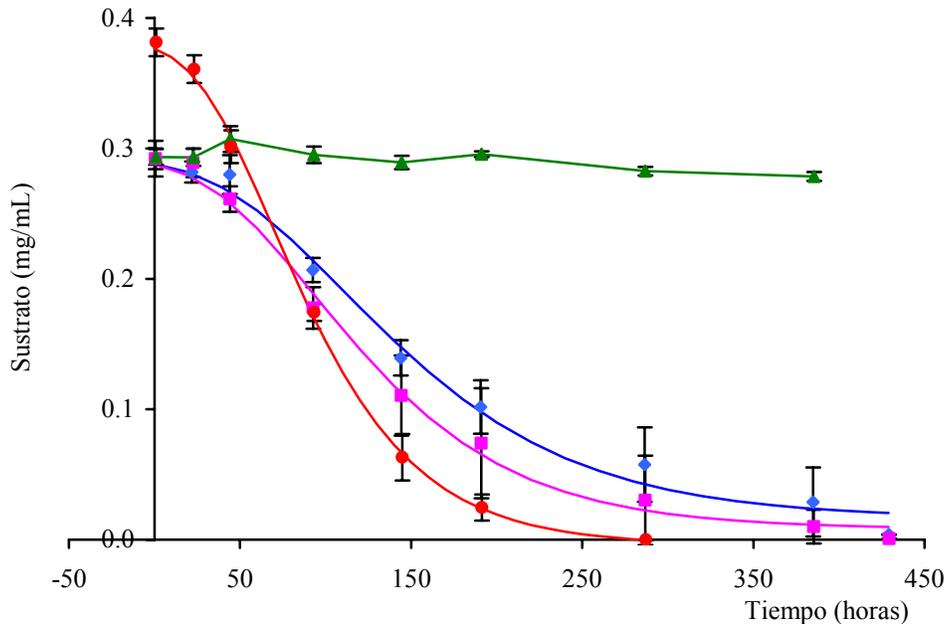


Figura 6.6. Árbol Filogenético utilizado para la identificación de las tres bacterias aisladas del consorcio *UAMI*: B1, B2 y B3.

6.2.4 Experimentos de degradación de MTBE, ETBE, TAME y TBA con el consorcio *UAMI* adaptado

Debido a que la cantidad de inóculo con la que se contaba para los primeros experimentos de enriquecimiento con el consorcio *UAMI* era muy poca y no se pudo determinar la biomasa inicial, los resultados reportados no fueron específicos, por lo que no son comparables con los datos de la literatura. Por esta razón y debido a que para estos estudios ya se contaba con suficiente cantidad del consorcio *UAMI*, se realizaron las cinéticas de degradación de oxigenados por este consorcio. En la Gráfica 6.12 se muestran las cinéticas de degradación de MTBE, ETBE, TAME y TBA por el consorcio *UAMI*.



Gráfica 6.12 Degradación de MTBE, ETBE, TAME y TBA por el consorcio *UAMI*. En estos experimentos se pudo determinar la biomasa de cada microcosmos. ◆ MTBE, ▲ ETBE, ■ TAME, ● TBA.

Puede observarse que el consorcio fue capaz de degradar al MTBE, TAME y TBA pero no al ETBE, probablemente debido al impedimento estérico que presentaría el grupo etilo unido al oxígeno del enlace éter, en la molécula del ETBE. En éste último caso se observó un decremento de la concentración inicial de solo un 5%, que se debe seguramente a un error experimental, ya que las mediciones de respirometría no mostraron consumo de oxígeno ni producción de bióxido de carbono (Tabla 6.6). Estos datos concuerdan con los reportados por François *et al.* (2002) que aislaron una cepa metanótrofa de *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012 que degrada MTBE, TBA y TAME, pero sólo degrada ligeramente ETBE. Para el consorcio *UAMI* el sustrato de más fácil degradación fue el TBA, lo que daría indicio que el paso limitante para la degradación del MTBE es la ruptura del enlace éter. Estos datos concuerdan con los reportados anteriormente para el mismo consorcio *UAMI*. Es posible que el consorcio *UAMI* degradara los oxigenantes MTBE, TAME y TBA, mediante la misma enzima inducible.

En la Tabla 6.6 se reportan los datos cinéticos específicos para los oxigenados degradados. Se observa que el TBA se consumió en más de un 99% en alrededor de 287 h, mientras que el MTBE y el TAME requirieron cerca de 430 h. No se observó la formación de TBA durante la degradación de MTBE, lo que indicaría que se degrada conforme se va formando. También se puede observar que la producción de CO₂ y el consumo de O₂ son cercanos al 50% lo que indica que la mineralización no es completa y sugiere que los compuestos se pueden utilizar para formar biomasa.

Tabla 6.6 Datos respirométricos y degradativos de oxigenantes de gasolina por el consorcio *UAMI*.

Sustrato	Consumo mg/g prot _{inicial}	Tiempo (horas)	% consumo	O ₂ % del teórico*	CO ₂ % del teórico*	V _{máx} mg/g prot _{inicial} ·h
MTBE	325.5	429.1	98.6	48.8	53.5	1.5
TAME	330.2	429.3	99.8	11.4	34.8	1.8
ETBE	331.6	385.4	5.1	-	-	-
TBA	430.9	287.1	>99.9	56.9	43.7	3.4

* Teórico: Oxidación completa

La velocidad máxima alcanzada con el consorcio *UAMI* para el MTBE (1.5 mg/g prot·h = 0.28 nmol/mg prot_{inicial}·min) es menor a las reportadas en la literatura. Por ejemplo Fortin & Deshusses (1999a) reportan un rango de velocidades de 1.9-3.8 nmol/mg prot·min con un cultivo mixto heterotrófico. Church *et al.* (2000) comprobaron que la velocidad de degradación de TAME, fue (al igual que este trabajo) del mismo orden de magnitud que la velocidad de degradación del MTBE. En el caso del TBA la velocidad lograda (3.4 mg/g prot_{inicial}·h = 0.765 nmol/mg prot·min) cae dentro del rango reportado en la bibliografía. Por ejemplo Liu *et al.* (2001) reportan con *Arthrobacter* (ATCC 27778) una velocidad de degradación cometabólica con *n*-butano de 0.002 nmol/mg prot·min, mientras que Piveteau *et al.* (2001) con *Burkholderia* sp. CIP I-2052 lograron un velocidad de 16.1 nmol/mg prot·min para metabolismo heterotrófico.

6.2.5 Conclusiones parciales con el consorcio *UAMI*

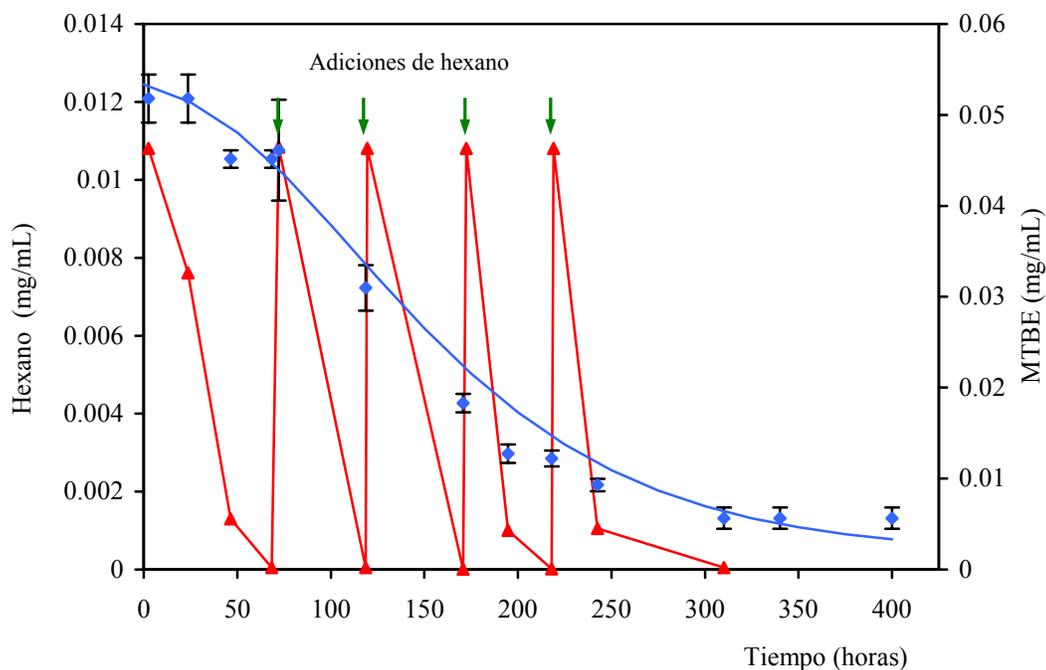
- 1) Mediante enriquecimiento de un cultivo, se obtuvo un consorcio microbiano compuesto por un hongo filamentoso rosa (no identificado) y al menos tres bacterias filamentosas.
- 2) El cultivo pudo degradar MTBE, TAME y TBA pero no ETBE.
- 3) El sustrato de más fácil degradación fue TBA lo que indica que la ruptura del enlace éter es el paso limitante en la oxidación del MTBE.
- 4) El análisis respirométrico (recuperación como CO₂ del carbono de alrededor de 35-54%) indica que el consorcio utiliza los sustratos para formar biomasa.
- 5) Los experimentos con los organismos aislados del consorcio muestran que se requiere la asociación simbiótica del hongo y al menos una de las tres bacterias aisladas. Ninguno de los organismos aislados fue capaz de degradar MTBE por separado.
- 6) La velocidad de degradación (1.5 mg/g prot_{inicial}·h = 0.28 nmol/mg prot_{inicial}·min) para MTBE es muy baja comparada con los datos reportados en la literatura (alrededor de un orden de magnitud).
- 7) Puesto que la velocidad de degradación del TBA es más del doble que la del MTBE (3.4 mg/g prot_{inicial}·h = 0.765 nmol/mg prot_{inicial}·min), con un porcentaje de

mineralización menor (43.7 vs 53.5), y si el resto del carbono se incorpora como biomasa, el TBA podría representar un sustrato de propagación mejor de los cultivos que degradan MTBE sin que se pierda la capacidad de degradación como en el caso de los medios ricos.

6.3 El consorcio S

6.3.1 Adaptación y evaluación de la capacidad degradativa del consorcio S

A partir del material de empaque de un biofiltro que operaba con hexano, se obtuvo mediante centrifugación a 4500 rpm durante 20 minutos un cultivo mixto denominado consorcio S, formado predominantemente por dos hongos filamentosos: *Fusarium* sp. y *Cladosporium* sp. el cual se utilizó como inóculo en frascos de aproximadamente 600 mL con válvulas mininert® y 25 mL de medio mineral a pH 4.0, para ensayos de degradación cometabólica de MTBE con *n*-hexano. En la Gráfica 6.13 se muestra la degradación de hexano y MTBE por este cultivo.



Gráfica 6.13 Degradación cometabólica de MTBE con *n*-hexano por el cultivo S. Los microcosmos se adicionaron con 10 μ L de *n*-hexano cada vez. \blacktriangle Hexano (en fase gaseosa), \blacklozenge MTBE (en fase líquida).

Se observa que el cultivo degradó completamente el hexano adicionado (5 adiciones de 10 μ L/botella cada una) en un periodo de 300 horas. El consumo de hexano por el cultivo, permitió la degradación cometabólica del MTBE (5 μ L/botella). Después de las 300 horas de cultivo, ya no se adicionó más hexano y la degradación del MTBE cesó, consumiendo un máximo de 89% en 300 horas. El cultivo no fue capaz de degradar MTBE en ausencia de hexano.

La Gráfica 6.13 muestra un decremento del 89% en la concentración del MTBE después de cinco adiciones de hexano, lo cual produjo un coeficiente cometabólico de 0.1 mg MTBE/mg hexano. Este valor fue menor al reportado por Garnier *et al.* (1999) con *Pseudomonas aeruginosa* (0.7 mg MTBE/mg pentano) o por Morales *et al.* (2004) con un consorcio microbiano (1 mg MTBE/mg pentano y 0.5-0.8 mg MTBE/mg hexano). Después de 300 horas de incubación, no se repitieron las adiciones de hexano y la degradación de MTBE se detuvo, su concentración por lo tanto, permaneció constante. La concentración de oxígeno residual en el headspace fue de 10%, lo cual condujo a limitación de O₂. No se observó acumulación de TBA. En otro experimento (no mostrado), no se observó degradación significativa durante un periodo similar cuando sólo se adicionó MTBE como única fuente de carbono. La velocidad de degradación cometabólica del MTBE fue de 3.7 mg MTBE/g proteína_{inicial} h (0.7 nmol/mg proteína min, r²=0.994), la cual fue alrededor del doble de la velocidad máxima reportada para la degradación cometabólica con *Graphium* sp. (Hardison *et al.* 1997), pero menor que los valores reportados para bacterias. Steffan *et al.* (1997) observaron una velocidad de degradación cometabólica con propano de 9.2 nmol/mg proteína·min con la bacteria ENV 421. Garnier *et al.* (1999) calcularon una velocidad de 3.9 nmol/mg proteína·min por *Pseudomonas aeruginosa* con *n*-pentano mientras Smith *et al.* (2003) determinaron una velocidad cometabólica por *Pseudomonas mendocina* KR-1 con *n*-pentano de 35.3 nmol/mg proteína·min y una velocidad promedio con *n*-alcanos (C₆-C₇) de 61.1 nmol/mg proteína·min. En este caso, los autores observaron acumulación de TBA. Para un consorcio microbiano, Morales *et al.* (2004) reportaron velocidades de degradación cometabólica de MTBE de 49, 12 y 32 nmol/mg proteína·min con pentano, hexano e isooctano, respectivamente. Los autores encontraron acumulación temporal de TBA.

En la Tabla 6.7 se resumen los datos cinéticos de degradación de MTBE y de respirometría para el consumo de la mezcla de hexano y MTBE.

Tabla 6.7 Resumen de datos respirométricos y de degradación cometabólica de MTBE con hexano.

Sustrato	Consumo mg	Tiempo (h)	V _{máx} mg/g prot _{inicial} ·h	% Consumo	O ₂ % del teórico*	CO ₂ % del teórico*
MTBE	3.2	310.1	3.7	89.1	-	-
Hexano	33	310.1	2.2**	>99.9	-	-
Total					49.6	58.8

* Teórico: Oxidación completa

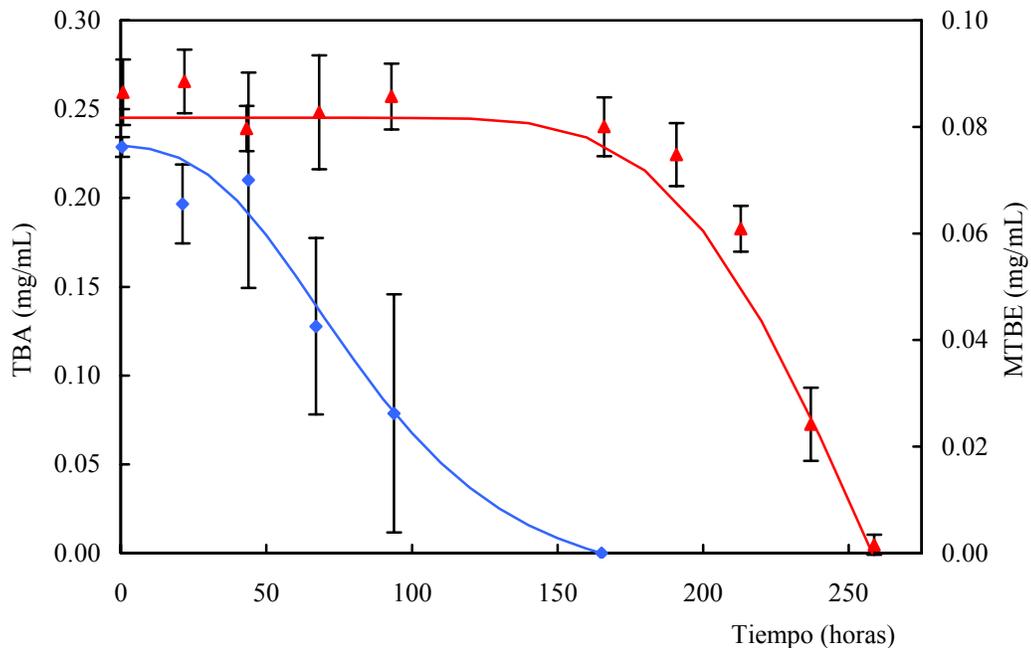
** Velocidad promedio

6.3.2 Degradación de MTBE y TBA por el cultivo *S* como únicas fuentes de carbono y energía

Para inducir la degradación no cometabólica del MTBE, es decir, como única fuente de carbono y energía, el cultivo se inoculó en medio mineral líquido (pH 4.5) y se adaptó a MTBE o a TBA a través de la transferencia sucesiva por tres meses. El cultivo mantenido en MTBE fue incapaz de degradar MTBE o TBA cuando de agregaron solos. Sin

embargo, el cultivo crecido en TBA inició la degradación de este último compuesto en el mismo periodo, como puede verse en la Gráfica 6.14. La máxima velocidad de degradación fue de $15.9 \text{ mg/g proteína}_{\text{inicial}} \cdot \text{h}$ ($3.57 \text{ nmol/mg proteína} \cdot \text{min}$, $r^2 = 0.982$). El balance de carbono mostró que el 61.6% del carbono se transformó en CO_2 . Posteriormente se probó la capacidad de degradación de MTBE por el cultivo crecido en TBA y se observó un consumo del 98% del MTBE inicial en 260 h (Gráfica 6.14) después de un periodo de adaptación de 190 horas. Entre las 190 y las 260 horas de cultivo, la velocidad de degradación del MTBE fue de $10.1 \text{ mg/g proteína}_{\text{inicial}} \cdot \text{h}$ ($1.91 \text{ nmol/mg proteína} \cdot \text{min}$, $r^2=0.985$). La concentración final de proteína mostró una cantidad despreciable de biomasa producida con ambos sustratos.

Los gránulos crecidos en TBA o MTBE en medio líquido observados al microscopio óptico mostraron estructuras predominantemente fúngicas (Figura 6.7). Se inocularon muestras de gránulos en medios sólidos: se sembraron en agar YPG para favorecer el crecimiento de los hongos a pH 4.5, en agar nutritivo a pH 7.0 para favorecer bacterias y en placas de medio mineral MM2 a pH 4.5 incubadas en vapores de TBA o MTBE. Las placas mostraron colonias de un hongo el cual se aisló, clasificó y depositó en el Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht, Países Bajos como *Fusarium solani* CBS 117476 (Figuras 6.8 y 6.9). Bajo el microscopio se observaron pocas bacterias en los cultivos líquidos y crecieron muy pocas colonias bacterianas a partir de gránulos vigorosamente homogenizados en medio YPGA a pH 4.5 y en agar nutritivo a pH 7.0. Ninguna de estas bacterias fue capaz de degradar MTBE o TBA, como única fuente de carbono y energía o por cometabolismo con hexano.

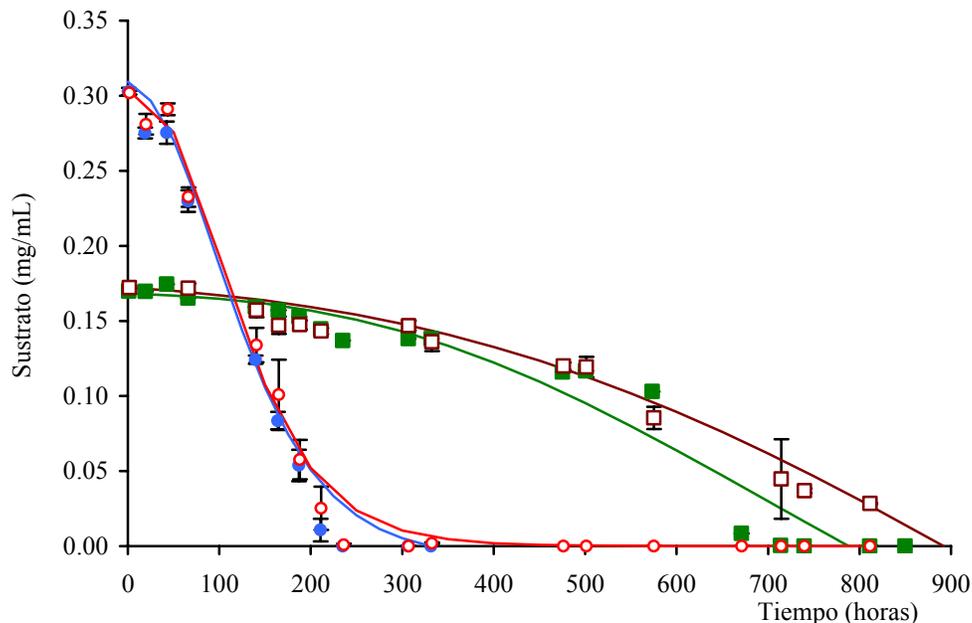


Gráfica 6.14 Degradación de TBA y MTBE por el cultivo fúngico *S* adaptado por tres meses en TBA. ◆ TBA, ▲ MTBE.

6.3.3 Degradación simultánea de MTBE y TBA por el cultivo S

Posteriormente se investigó la influencia que el TBA tiene en la degradación del MTBE y viceversa, para lo cual se midió la degradación de una mezcla de 1.5 μL de MTBE y 2 μL de TBA en microcosmos de 60 mL con 5 mL de medio mineral líquido.

La Gráfica 6.15 muestra que la degradación del MTBE no se afectó negativamente cuando se añadió TBA al principio del cultivo, el perfil de degradación es similar en los microcosmos con MTBE solo y en presencia de TBA durante 300 horas, tiempo en el cual el MTBE se consumió alrededor del 17% y estuvo presente junto con el TBA. La variación observada después de 300 h de cultivo pudo deberse a error experimental y no a la presencia del TBA ya que para este momento éste estaba totalmente agotado. Las tasas de degradación de MTBE fueron similares para ambos consorcios (2.3 y 2.5 $\text{mg/g proteína}_{\text{inicial}} \cdot \text{h}$). Por otro, lado la presencia del MTBE pareció no afectar la degradación del TBA, siendo los perfiles de degradación y las velocidades de éste último muy similares solo o en presencia de MTBE (12.4 y 12.9 $\text{mg/g proteína} \cdot \text{h}$ respectivamente). Estos datos sugieren que la enzima que oxida al TBA es diferente de la enzima que oxida al MTBE; si fuera la misma enzima habría un efecto competitivo entre ambos sustratos, y ambos hubieran sido afectados negativamente en la presencia del otro. Existen en la literatura algunos reportes que indican que el MTBE y el TBA son degradados por diferentes enzimas por algunos cultivos. Los datos de Deeb *et al.* (2000b) sugieren que el cultivo de *R. gelatinosus* PM1 degrada MTBE y TBA por enzimas monooxigenasas inducibles diferentes.



Gráfica 6.15 Efecto de la presencia del TBA en la degradación del MTBE y viceversa por el cultivo S. ● TBA solo, ○ TBA en presencia de MTBE, ■ MTBE solo, □ MTBE en presencia de TBA.

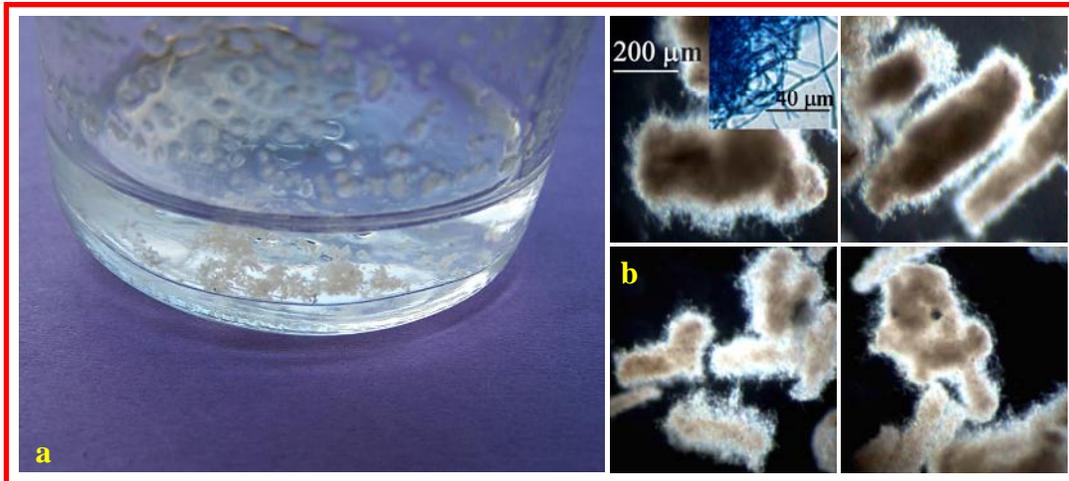


Figura 6.7 (a) Gránulos del cultivo *S* en medio líquido con TBA o MTBE; (b) gránulos observados al microscopio en campo oscuro. También se observa el borde de un gránulo en campo claro teñido con azul de lacto fenol. Se aprecia la dominancia de estructuras filamentosas. Se observaron pocas bacterias.

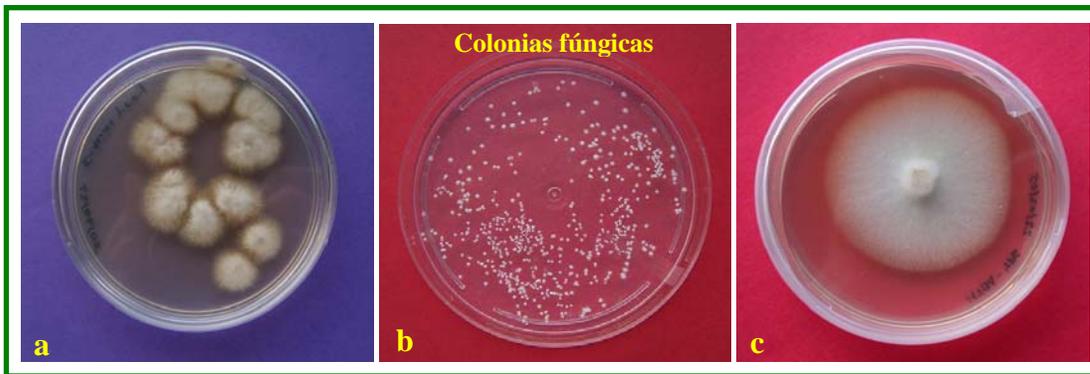


Figura 6.8 Cultivos del consorcio *S* en: a) agar nutritivo a pH 7.0, b) MM2 con vapores de TBA o MTBE a pH 4.5 y c) medio YPG a pH 4.5. Se observó la dominancia de los hongos sobre las bacterias.

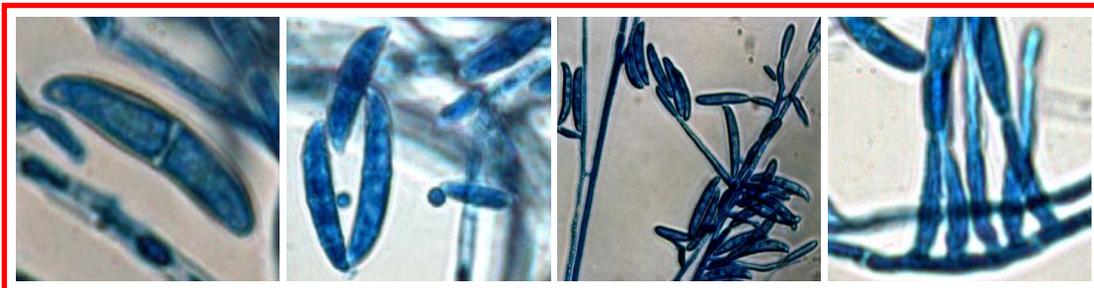
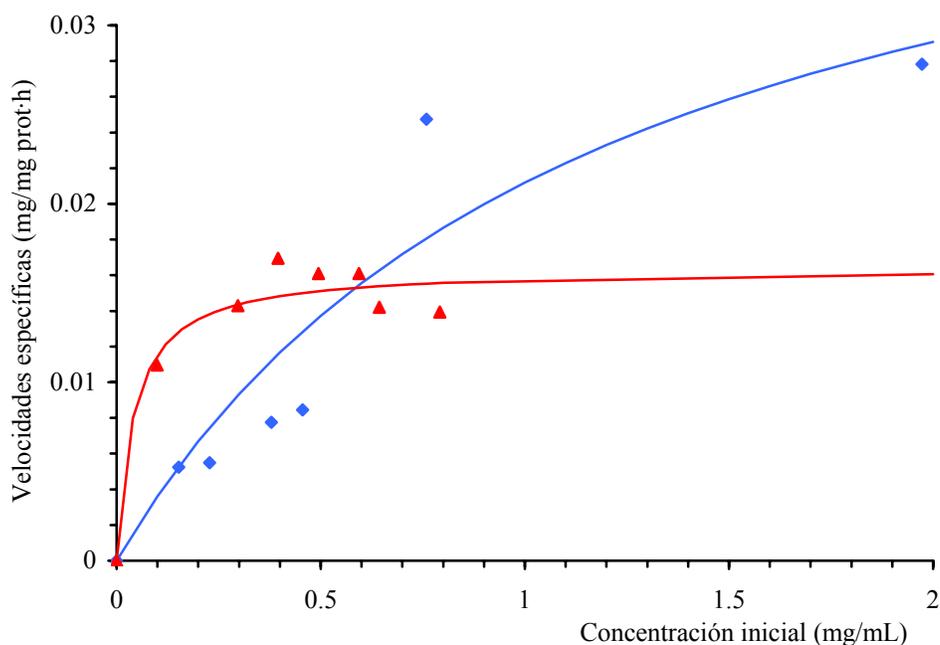


Figura 6.9 Estructuras características de *Fusarium solani* CBS 117476 cultivadas en medio mineral, en agar nutritivo y en medio YPG.

La degradación del TBA es más rápida que la del MTBE lo que sugiere que la ruptura del enlace éter es el paso limitante en la degradación de este oxigenante por este cultivo.

6.3.4 Determinación de las velocidades de degradación de TBA y MTBE

Se estudió la velocidad de oxidación de TBA y MTBE como una función de la concentración inicial de sustrato en microcosmos de 60 mL conteniendo 5 mL de medio mineral. Como puede verse en la Gráfica 6.16, el cultivo degradó TBA cuando se adicionó a volúmenes iniciales entre 1 y 13 μL (0.15-1.97 mg/mL en fase líquida) y MTBE entre 1 y 8 μL (0.1-0.8 mg/mL en fase líquida). El TBA o MTBE no se degradaron cuando se agregaron a volúmenes mayores de 13 y 8 μL respectivamente. Los datos se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten. Para el TBA la $V_{m\text{TBA}}$ fue de 46.3 mg TBA/g proteína·h (i.e. 10.4 nmol TBA/mg proteína·min, $r^2 = 0.915$) y la $K_{m\text{TBA}}$ fue de 1.19 mg/mL. François *et al.* (2002) calcularon un $K_{m\text{TBA}}$ de 1.1 mM (0.082 mg/mL) con *Mycobacterium austroafricanum*. La afinidad específica (V_m/K_m), para la degradación de TBA fue de 0.020 L/g peso seco·h (suponiendo un contenido de proteína celular del 50%). La mineralización, definida como la fracción de carbono recuperada como CO_2 de la degradación del TBA, decreció cuando la concentración inicial se incrementó (de 96.6% para 0.15 mg/mL a 53.4% para 1.97 mg/mL), indicando que la asimilación del TBA fue mejor a las concentraciones más altas. Sin embargo, la degradación final de TBA fue menor a las más altas concentraciones (del 100% para 0.15 mg/mL en 235 h a 70.3% para 1.97 mg/mL en 500 h), debido quizás a limitación por la concentración de O_2 en el headspace (<4%). El rendimiento se determinó a partir de la producción de CO_2 suponiendo que el carbono no mineralizado se incorporó a biomasa (fórmula elemental $\text{CH}_{1.79}\text{O}_{0.5}\text{N}_{0.2}$ con 5% de sales, ver Apéndice A). Con esta relación se calculó un rendimiento promedio para TBA de 0.36 g biomasa/g TBA. Piveteau *et al.* (2001) calcularon un rendimiento para TBA de 0.54 g biomasa/g TBA para *Burkholderia* sp. CIP I-2052. Para MTBE, la $V_{m\text{MTBE}}$ fue de 16.4 mg MTBE/g proteína·h (3.1 nmol MTBE/mg proteína·min, $r^2 = 0.949$) y el $K_{m\text{MTBE}}$ fue de 0.042 mg/mL. Salanitro *et al.* (1994) observaron una velocidad máxima de degradación con el cultivo BC-1 de 34 mg/g peso seco·h (12.9 nmol/mg proteína·min, suponiendo un contenido de proteína celular del 50%). Fortín *et al.* (2001) reportaron una velocidad de degradación con el consorcio *F* (el mismo que se utilizó como referencia en este trabajo), en el rango de 18 a 277 mg/g peso seco·h (6.7-106.7 nmol/mg proteína·min), y un $K_{m\text{MTBE}}$ de 17 μM (0.0015 mg/mL). En este trabajo, se calculó para *Fusarium solani* CBS 117476, una afinidad específica para la degradación de MTBE de 0.19 L/g peso seco·h, 10 veces más alta que la afinidad de TBA. Esto es menor que los valores reportados anteriormente para bacterias (Fortin *et al.* 2001). El rendimiento promedio calculado para MTBE fue menor que el del TBA (0.18 g biomasa/g MTBE), lo cual es consistente con los datos reportados por otros autores para bacterias o cultivos mixtos (Salanitro *et al.* 1994), Fortin & Deshusses 1999a).



Gráfica 6.16 Efecto de la concentración inicial de TBA y MTBE en las velocidades de degradación específicas por el cultivo *S*. ◆ TBA, ▲ MTBE.

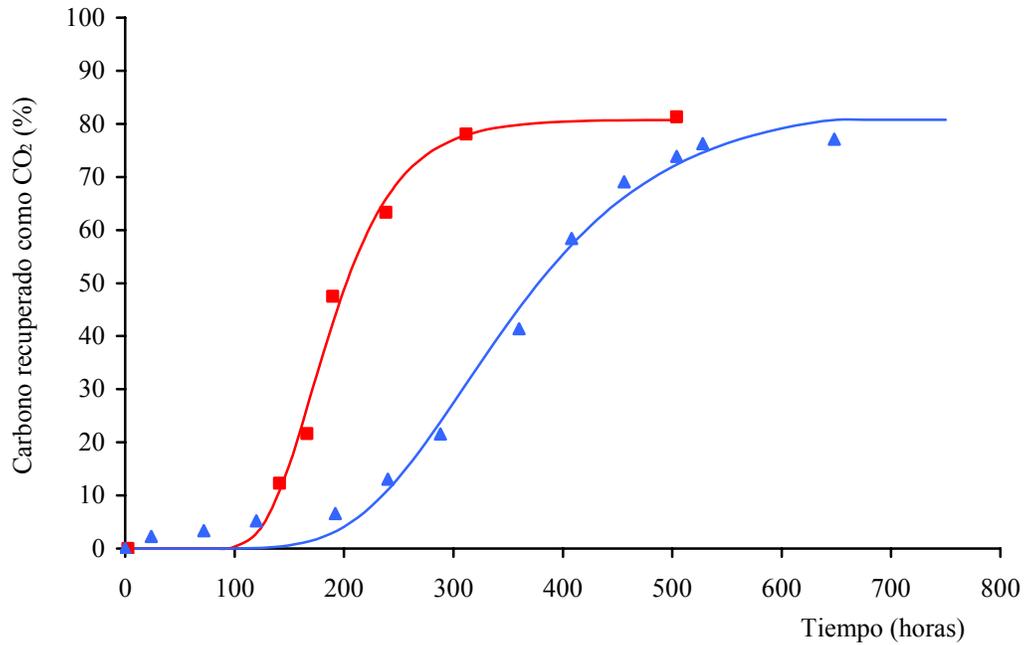
6.3.5 Experimentos de mineralización con el cultivo *S*

Se probó el cultivo con ^{14}C -MTBE para confirmar la mineralización. La Gráfica 6.17 muestra que el 77% del carbono total se convirtió a $^{14}\text{CO}_2$. El cultivo degradó el MTBE marcado más lentamente que el MTBE sin marcar, debido posiblemente al etanol presente como solvente de la forma radiactiva. El resultado de mineralización es más alto que los datos reportados para la mineralización con algunas bacterias (Salanitro *et al.* 1994, Kane *et al.* 2001). Los experimentos con MTBE sin marcar mostraron que nada del MTBE o TBA permaneció después de 500 horas de cultivo.

6.3.6 Degradación de otros compuestos por el cultivo *S*

Se estudió la habilidad del cultivo *S* (*Fusarium solani* CBS 117476) de degradar los oxigenantes de gasolina ETBE, TAME y los intermediarios HIBA y MHP que han sido reportados en la degradación de MTBE (Tabla 6.8). Todos los sustratos, excepto el ETBE fueron degradados, sugiriendo especificidad por el grupo metoxi. Este resultado es consistente con los datos reportados por François *et al.* (2002). TAME fue casi completamente degradado (98.5%) en 72 horas (Gráfica 6.18) y se recuperó el 46.4% del carbono como CO_2 . No se detectó la acumulación de intermediarios. La velocidad máxima de consumo calculada para el TAME fue de 36 mg/g proteína·h. Su rendimiento se estimó en 0.54 g biomasa/g TAME. La degradación de MHP e HIBA se mostró indirectamente por

la producción de CO₂ y el consumo de oxígeno. La mineralización de MHP fue de 92.0% y 54.4% para el HIBA.



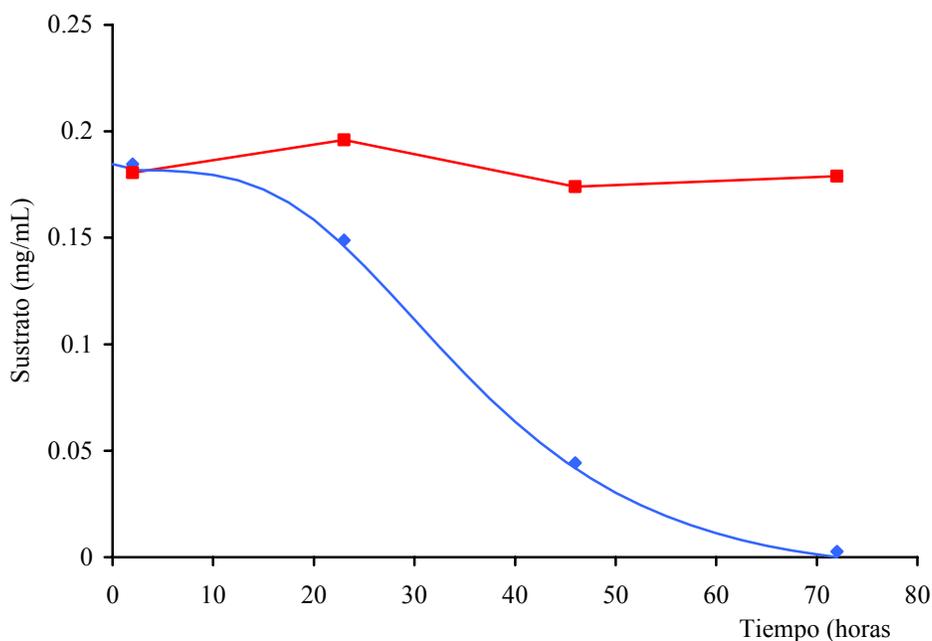
Gráfica 6.17 Porcentaje de mineralización de ¹⁴C-MTBE uniformemente marcado, como CO₂ por el cultivo *S.* ¹⁴C-MTBE inicial 1.66×10^{-4} mCi. ▲ ¹⁴CO₂, ■ CO₂ control sin marcar.

Tabla 6.8 Datos de degradación de los oxigenantes TAME y de los Intermediarios HIBA y MHP.

Sustrato*	Tiempo (horas)	% consumo	CO ₂ % del teórico**
TAME	72	98.5%	46.4%
HIBA	714	47.6%	54.4%
MHP	714	100.0%	92.0%

* El ETBE no de degradó

** Teórico: Oxidación completa



Gráfica 6.18 Degradación de los oxigenantes TAME y ETBE por el cultivo *S*. ♦ TAME, ■ ETBE.

6.3.7 Propagación del cultivo *S* con sustratos alternativos de crecimiento

Con el objeto de propagar el cultivo *S* sin perder la capacidad de degradación de compuestos oxigenantes, se buscaron sustratos alternativos de crecimiento que permitieran obtener mejores rendimientos que el MTBE o TBA. Como se mencionó en la sección 5.6.4, se seleccionaron el etanol, glicerol, extracto de malta, ácido cítrico y ácido málico. A partir de gránulos degradadores de MTBE y TBA, se obtuvo la biomasa crecida durante una semana en cada uno de los sustratos (5 g/L) y se dispersó mediante un homogenizador de vidrio, que se utilizó como inóculo 10% v/v de microcosmos alimentados con MTBE o TBA. En el presente trabajo, se encontró que el cultivo no axénico de *Fusarium solani* CBS 117476 (consorcio *S*) creció bien en glicerol pero fue incapaz de oxidar MTBE o TBA en un periodo de incubación de 3 meses, es decir, la capacidad de degradación se perdió. Johnson *et al.* (2004), encontraron que un cultivo de *Mycobacterium vaccae* JOB5 puede utilizar glicerol, como sustrato de crecimiento y que células crecidas en glicerol son capaces de degradar MTBE, TAME y TBA, pero no ETBE. En el caso de *Fusarium solani* CBS 117476, el cultivo pudo crecer en los ácidos cítrico y málico, pero al igual que con el glicerol, el cultivo fue incapaz de degradar MTBE y TBA. Johnson *et al.* (2004), mostraron que su cultivo crecido en succinato oxidó MTBE mediante la acción de una enzima alcano monooxigenasa con acumulación de TBA. Spigno *et al.* (2003) y Arriaga & Revah (2005) utilizaron exitosamente extracto de malta (EM) para la propagación de los hongos *Aspergillus niger* y *Fusarium solani* CBS 117476 (reportado inicialmente como *Fusarium* sp) respectivamente, y su posterior utilización en la degradación de hexano en bio-

reactores, lo que indica que EM no interfiere en la formación de las alcanomonooxigenasas responsables de la degradación del hexano. En este trabajo *Fusarium solani* CBS 117476 crecido en EM, fue incapaz de degradar MTBE o TBA en un periodo de tres meses. Sin embargo, si tomamos en cuenta que el mismo cultivo crecido sólo en medio mineral con TBA durante el mismo periodo sí fue capaz de oxidar este compuesto (sección 6.3.2); puede pensarse que el EM interfirió de algún modo en la formación de la enzima responsable de la degradación del TBA y que probablemente esta no sea una alcanomonooxigenasa.

Bekri & Pauss (2002), estudiaron al etanol como un sustrato que permitiera la propagación de un consorcio bacteriano degradador de ETBE sin perder la capacidad de degradación del oxigenante. Ellos encontraron que el etanol es completamente degradado y el consorcio crece tres veces más rápido con ETBE más etanol que con ETBE solo. Además, la biodegradación de ETBE solo no se afectó negativamente cuando el cultivo creció previamente en etanol. En el caso de *Fusarium solani* CBS 117476, se observó que el cultivo creció bien en etanol, sin embargo cuando el consorcio crecido en etanol se incubó solamente con MTBE o TBA, la biomasa tendió a lisarse. El cultivo sí logró recuperar la actividad de degradación de MTBE y TBA después de varias semanas, pero debido a la lisis celular, se perdió la mayor parte de la biomasa. Este fenómeno se observó repetidamente en varios experimentos posteriores, es decir, la ventaja del etanol como sustrato de propagación es pobre ya que la cantidad de biomasa activa final fue solo ligeramente superior a la biomasa antes de la propagación en etanol. Aún así, tal vez resulte prometedora la propagación del cultivo en un reactor de membrana alimentado con etanol y MTBE o TBA.

6.3.8 Conclusiones parciales con el cultivo S

- 1) Se obtuvo un cultivo fúngico no axénico (*Fusarium solani* CBS 117476) capaz de degradar MTBE, TAME y TBA pero no ETBE como única fuente de carbono y energía.
- 2) El n-hexano fue un inductor cometabólico de la degradación de MTBE sin adaptación previa del cultivo.
- 3) La presencia del TBA permitió que el cultivo S, incapaz de degradar MTBE, pudiera utilizarlo como única fuente de carbono y energía, posteriormente al crecimiento en TBA, es decir, sirvió como inductor de la enzima que degrada MTBE.
- 4) Los datos sugieren que la enzima que degrada TBA es diferente de la enzima que degrada MTBE.
- 5) V_{mTBA} (46.3 mg TBA/g proteína·h, i.e. 10.4 nmol TBA/mg proteína·min, $r^2 = 0.915$) fue mayor que V_{mMTBE} (16.4 mg MTBE/g proteína·h, i.e. 3.1 nmol MTBE/mg proteína·min, $r^2 = 0.949$), lo que indica que la ruptura del enlace éter es el paso limitante para la oxidación de MTBE por este cultivo.

- 6) El rendimiento en TBA (0.36 g biomasa/g TBA) estuvo dentro del rango de los valores reportados en la literatura. Piveteau *et al.* (2001) reporta 0.54 g biomasa/g TBA con *Burkholderia* sp. CIP I-2052.
- 7) El rendimiento en MTBE (0.18 g biomasa/g MTBE) fue bajo y dentro del rango reportado en la bibliografía. Fortin & Deshusses (1999a) reportan 0.1 g/g MTBE y Hatzinger *et al.* (2001) 0.4 g/g.
- 8) Los experimentos con MTBE marcado confirmaron que el cultivo mineraliza 77% de carbono a CO₂.
- 9) *Fusarium solani* CBS 117476 degradó los intermediarios de la degradación de MTBE HIBA y MHP.
- 10) El etanol tiene el potencial de servir como un sustrato de crecimiento del cultivo sin perder la capacidad de degradación del MTBE pero es necesario realizar más estudios al respecto.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

Los hongos filamentosos son microorganismos que poseen algunos atributos que les permiten un buen potencial para la biodegradación de varios compuestos contaminantes xenobióticos, pero su uso en estrategias de biorremediación es limitado comparado con el uso de las bacterias.

El objetivo del presente proyecto fue evaluar la capacidad de los hongos filamentosos de degradar compuestos oxigenados utilizados como aditivos de las gasolinas. Los resultados experimentales obtenidos en este trabajo demostraron que la degradación de los oxigenantes de la gasolina: MTBE, ETBE, TAME y TBA como única fuente de carbono y energía, por cultivos fúngicos es posible, por lo cual su aplicación en sistemas de remediación tales como la biofiltración para la eliminación de este tipo de compuestos, resultaría interesante.

Se logró la obtención de dos cultivos mixtos (Consortio *H*, y Consortio *UAMI*) formados por al menos un hongo filamentoso y algunas bacterias y un cultivo fúngico no axénico de *Fusarium solani* CBS 117476 (Cultivo *S*) capaces de degradar los oxigenantes de la gasolina MTBE, TAME y TBA como únicas fuentes de carbono y energía, además del ETBE en el caso del consorcio *H*.

El cultivo de *Fusarium solani* degradó el MTBE a una velocidad (16.4 mg MTBE/g proteína_{inicial}·h ó 3.1 nmol/mg proteína·h) alrededor de diez veces mayor a lo reportado para la degradación cometabólica con butano por el hongo *Graphium* sp (0.35 nmol/mg prot·h). Además, la velocidad observada está dentro del rango observado para bacterias, pero cercana al límite inferior (la literatura muestra un rango muy grande de velocidades de degradación de MTBE: 0.002 - 86 nmol/mg proteína·h ver tabla 3.2). La velocidad para el TBA (10.4 nmol/mg proteína·h) también estuvo dentro del rango reportado (0.002-16.1 nmol/mg proteína·h) pero más cercana al límite superior. Las velocidades observadas con el consorcio *UAMI* fueron menores.

El rendimiento estimado para el cultivo de *Fusarium solani* con MTBE fue de 0.18 g biomasa/g MTBE, el cual es bajo comparado con los de sustratos de fácil asimilación pero dentro del rango de los valores reportados en la bibliografía para bacterias o cultivos mixtos (0.1-0.44 g biomasa/g MTBE, ver tabla 3.2). El rendimiento calculado para TBA fue mayor al del MTBE. Para el TBA no existen muchos datos de rendimiento reportados. En este trabajo se obtuvo un valor de 0.36 g biomasa/g TBA que es menor al calculado por Piveteau *et al.* (2001) de 0.54 g biomasa/g TBA. El TBA fue, en todos los casos, el sustrato de más rápida degradación. El MTBE y el TAME se degradaron a velocidades similares entre sí, lo que indica que la ruptura del enlace éter es posiblemente el paso limitante en la degradación por los cultivos estudiados. Puesto que el rendimiento del TBA es mayor (el doble) al del MTBE y ya que el TBA es un intermediario de la degradación del MTBE, es probable que el grupo metilo del MTBE se mineralice completamente y no se incorpore como biomasa.

Al parecer la ruta de degradación con *Fusarium solani* CBS 117476 es similar a la planteada para bacterias, ya que puede degradar sin dificultad los intermediarios planteados en la ruta bacteriana: TBA, MHP e HIBA.

La degradación de los oxigenantes fue inducible y la actividad degradativa se perdía fácilmente si los cultivos crecían en medios ricos, lo que limitaba la propagación a medios minerales simples con los oxigenantes como inductores de la degradación. La etapa de adaptación de los cultivos para degradar oxigenantes fue en general un proceso lento.

Aunque los datos experimentales aportan evidencia del papel activo de los hongos en la degradación de los oxigenantes, en ningún caso se logró el aislamiento de especies individuales degradadoras de estas sustancias.

Algunos aspectos importantes a tener en cuenta durante la investigación futura de la degradación de oxigenantes de gasolina con los microorganismos estudiados incluyen:

- La propagación de los cultivos utilizando etanol como sustrato de crecimiento en la presencia de los oxigenantes estudiados. Los experimentos realizados usando primero etanol y posteriormente los oxigenantes mostraron indicios prometedores, pero al parecer se obtienen mejores resultados si el crecimiento se realiza en la presencia simultánea del etanol + oxigenante (Bekri & Paus 2002). Por otro lado, los resultados alcanzados en el presente trabajo muestran que el TBA puede ser un mejor sustrato para la inducción de la degradación de oxigenantes que el MTBE o TAME. Mezclas etanol + TBA sería una combinación interesante. Estos estudios podrían realizarse en reactores de membrana para hacerse de modo continuo.
- Para dilucidar el tipo de enzimas oxigenasas implicadas en la degradación de los oxigenantes, se propone estudiar el efecto de inhibidores enzimáticos, por ejemplo el acetileno y el etileno, ambos inhibidores de monooxigenasas tipo citocromo P450 (Hardison *et al.* 1997)
- En algunos experimentos se observó una posible limitación por oxígeno, por lo que se necesitan realizar algunos experimentos para determinar la importancia y uso del O₂ en los cultivos.
- Complementar las técnicas de análisis por cromatografía de gases con algunas otras técnicas tales como HPLC que permitieran el estudio de los metabolitos no volátiles en la fase acuosa, con el fin de establecer de modo más preciso la ruta de degradación de oxigenantes por los cultivos estudiados.
- Se proponen realizar experimentos de degradación en matrices sólidas. Con el fin de evaluar el uso potencial de los cultivos en sistemas tales como biofiltros.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Acuña-Askar K, Englande Jr. AJ, Hu C, Jin G (1999) Methyl 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.
- 2 Acuña-Askar K, Englande Jr. AJ, Hu C, Jin G (2000) Methyl tertiary-butyl ether (MTBE) biodegradation in batch and continuous upflow fixed -biofilm reactors. *Water Sci. Technol.* **42**(5-6):153-161.
- 3 Adam G, Gamoh K, Morris DG, Duncan H (2002) Effect of alcohol addition on the movement of petroleum hydrocarbon fuels in soil. *Sci. Total Environ.* **286**:15-25.
- 4 Al Farayedhi AA (2002) Effects of octane number on exhaust emissions of a spark ignition engine. *Int. J. Energy Res.* **26**:279-289.
- 5 Alba J, Conde E, Pérez-Guevara F (2003) Degradation of the main components of cellulose-paint thinner by the mould *Scopulariopsis brevicaulis* cultured on rice hulls. *Lett. Appl. Microbiol.* **37**(1):7-11.
- 6 Ancillotti F, Fattore V (1998) Oxygenate fuels: Market expansion and catalytic aspect of synthesis. *Fuel Process. Technol.* **57**:163-194.
- 7 Annesini MC, Gironi F, Monticelli B (2000) Removal of oxygenated pollutants from wastewater by polymeric resins: data on adsorption equilibrium and kinetics in fixed beds. *Wat. Res.* **34**(11):2989-2996.
- 8 April TM, Foght JM, Currah RS (2000) Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada. *Can. J. Microbiol.* **46**:38-49.
- 9 Arriaga S, Revah S (2005) Improving hexane removal by enhancing fungal development in a microbial consortium biofilter. *Biotechnol. Bioeng.* **90**(1):107-115.
- 10 Atkinson B, Mavituna F (1991) *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*. Second edition, Stockton Press.
- 11 Barr DP, Aust SD (1994) Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environ. Sci. Technol.* **28**(2):78A-87A.
- 12 Bekri M, Pauss A (2002) Growth of ETBE-degrading bacterial consortia on diverse carbon sources. Poster in: *Microbiology of hydrocarbons: state of the art and perspectives. International conference. IFP*, June 6-7, Rueil-Malmaison, France.

- 13 Bennett JW, Faison BD (1997) Use of fungi in biodegradation. In: Hurst CJ, Knudsen GR, McInerney MJ, Stetzenbach LD, Walter MV, eds. *Manual of Environmental Microbiology*, Washington DC: ASM Press, pp. 758–765.
- 14 Berman MH, Frazer AC (1992) Importance of tetrahydrofolate and ATP in the anaerobic O-demethylation reaction for phenylmethylethers. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:925–931.
- 15 Borden RC, Daniel RA, LeBrun LE, Davis CW (1997) Intrinsic biodegradation of MTBE and BTEX in a gasoline-contaminated aquifer. *Water Res. Res.* **33**:1105–1115.
- 16 Bozzola JJ, Russell LD (1991) *Electron microscopy: principles and techniques*. Jones & Barlett Publishers, 560 p. USA.
- 17 Bradley PM, Landmeyer JE, Chapelle FH (1999) Aerobic mineralization of MTBE and *tert*-butyl alcohol by stream-bed sediment microorganisms. *Environ. Sci. Technol.* **33**(11):1877-1879.
- 18 Bradley PM, Chapelle FH, Landmeyer JE (2001a) Methyl *t*-butyl ether mineralization in surface-water sediment microcosms under denitrifying conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(4):1975-1978.
- 19 Bradley PM, Chapelle FH, Landmeyer JE (2001b) Effect of redox conditions on MTBE biodegradation in surface water sediments. *Environ. Sci. Technol.* **35**(23):4643-4647.
- 20 Braids OC (2001) Commentaries and perspectives. MTBE-Panacea or problem. *Environ. Forensics* **2**:189-196.
- 21 Braun-Lüllemann A, Majcherczyk A, Hüttermann A (1997) Degradation of styrene by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**:150-155.
- 22 Brown A, Deviny JS, Browne TE, Chitwood D (1997) A review of treatment technologies for methyl tertiary butyl ether (MTBE) in drinking water. In: *Proceedings of the American Chemical Society. Pacific Conference on Chemistry and Spectroscopy: Komex H2O Science*, p 1-19 April 22, San Francisco CA.
- 23 CAG (Contaminación del agua por gasolina) Consulta en Internet.
<http://www.conacyt.mx/comunicacion/agencia/notas-vigentes/trat-gasolina.html>
Consultada (14/09/05).
- 24 Calatayud L, Jácomel S (2003) El CEVIM suma fuerzas para diversificar la industria cañera. *La Ciencia y el Hombre. Universidad Veracruzana*. XVI(1) Enero-abril 2003. Disponible en:
<http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol16num1/articulos/cevim/cevim.htm>

- 25 Calderón F (2006) Propuesta diaria. Fomentar el uso de biocombustibles y aditivos para gasolinas aprovechando el potencial cañero de México. Disponible en: http://www.felipe.org.mx/propuestaDiaria/propuestas/propdia_20.htm
- 26 Cameron MD, Timofeevski S, Aust SD (2000) Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**:751-758.
- 27 Church CD, Tratnyek PG, Pankow JF, Landmeyer JE, Baehr AL, Thomas MA, Schirmer M (1999) Effects of environmental conditions on MTBE degradation in model column aquifers. In: *Proceedings of the Technical Meeting of USGS, Toxic Substances Hydrology Program*, Vol. 3 pp 93-101. Charleston, SC.
- 28 Church CD, Tratnyek PG, Scow KM (2000) Pathways for the degradation of MTBE and other fuel oxygenates by isolate PM1. Preprints of *Extended Abstracts, Am. Chem. Soc.* **40**(1):261-263.
- 29 Cowan RM, Park K (1996) Biodegradation of the gasoline oxygenates MTBE, ETBE, TAME, TBA, and TAA by aerobic mixed cultures. In: *Proceedings of the 28th Mid-Atlantic Industrial and Hazardous Waste Conference*, **28**:523-530, Buffalo, NY.
- 30 CP (Contaminación por petróleo) Consulta en Internet. http://www.sagan-gea.org/hojared_AGUA/paginas/14agua.html
Consultada (14/09/05)
- 31 Craig HD, Sisk WE, Nelson MD, Dana WH (1995) Bioremediation of explosives-contaminated soils: a status review. In: *Proceedings of the 10th Annual Conference on Hazardous Waste Research. Kansas State University*, May 23-24, Manhattan, Kansas.
- 32 Criddle CS (1993) The Kinetics of cometabolism. *Biotechnol. Bioeng.* **41**(11):1048-1056.
- 33 Cuatecontzi DH, Gasca J, González U, Guzmán F (2006) Opciones para mitigar las emisiones de gases de efecto invernadero del sector transporte. Instituto Nacional de Ecología. Página consultada en junio 2006. Disponible en: <http://www.ine.gov.mx/ueajei/publicaciones/libros/437/dick2.html>
- 34 Deeb RA (1999) Aerobic biotransformation of BTEX compounds and MTBE in contaminant mixtures by enriched and pure cultures. PhD Thesis. University of California at Berkeley, Berkeley, CA.
- 35 Deeb RA, Scow KM, Álvarez-Cohen L (2000a) Aerobic MTBE biodegradation: an examination of past studies, current challenges and future research directions. *Biodegradation.* **11**:171-186.

- 36 Deeb RA, Nishino S, Spain J, Hu HY, Scow KM, Álvarez-Cohen L (2000b) MTBE and benzene biodegradation by a bacterial isolate via two independent monooxygenase-initiated pathways. *Preprints of Extended Abstracts. Am. Chem. Soc.* **40**:280-282.
- 37 Deeb RA, Hu HY, Hanson JR, Scow KM, Álvarez-Cohen L (2001a) Substrate interactions in BTEX and MTBE mixtures by an MTBE-degrading isolate. *Environ. Sci. Technol.* **35**(2):312-317.
- 38 Deeb RA, Sue S, Spiers D, Kavanaugh MC (2001b) Field studies to demonstrate the cost and performance of air stripping for the removal of MTBE from groundwater. In: *Proceedings of the 94th Annual Meeting & Exhibition, AWMA*, June 24-28, Orlando, Florida, USA.
- 39 Deeb RA, Chu KH, Shih T, Linder S, Suffet IM, Kavanaugh MC, Álvarez-Cohen L (2003) MTBE and other oxygenates: environmental sources, analysis, occurrence, and treatment. *Environ. Eng. Sci.* **20**(5):433-447.
- 40 Deshusses MA (2000) MTBE biodegradation: Lessons from laboratory experiments. Presented at the MTBE Biodegradation Workshop, Cincinnati, OH, February 1-3.
- 41 Difco (2006) Manual de medios de cultivo. Página electrónica de Becton Dickinson. Disponible en: <http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/difcoBblManual.asp> Consultada en enero 2006.
- 42 Dore J, Bryant MP (1990) Metabolism of one-carbon compounds by the ruminal acetogen *Syntrophococcus sucromutans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:984-989.
- 43 Dupasquier D, Revah S, Auria R (2002) Biofiltration of methyl *tert*-butyl ether vapors by cometabolism with pentane: modeling and experimental approach. *Environ. Sci. Technol.* **36**(2):247-253.
- 44 Eilers A, Rüngeling E, Stündl UM, Gottschalk G (1999) Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta* DSM 3375 depends on cytochrome P-450. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**:75-80.
- 45 Erdal S, Goldstein BD (2000) Methyl *tert*-butyl ether as a gasoline oxygenate: lessons for environmental public policy. *Annu. Rev. Energy Environ.* **25**:765-802.
- 46 Ertola R, Yantorno O, Mignone C. (1994). Microbiología Industrial. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Monografía de la Serie de Biología. Capítulo 5: Crecimiento microbiano. Pág 44.
- 47 ERG (2000) Summary of workshop on biodegradation of MTBE. *Eastern Research Group, Inc. (para EPA)*, EPA/625/R-01/001A, February 45 pp.

- 48 EUM-CAM (2002) Programa para mejorar la calidad del aire en la Zona Metropolitana del Valle de México 2002-2010. *Estados Unidos Mexicanos, Comisión Ambiental Metropolitana*. PROAIRE 2002-2010. Disponible en:
http://ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/consultaPublicacion.html?id_pub=394&id_tema=6&dir=Consultas
- 49 EUM-CAM (2004) Programa para mejorar la calidad del aire en la Zona Metropolitana del Valle de México (PROAIRE) 2002-2010. Informe Ejecutivo de Avances 2002-2003. *Estados Unidos Mexicanos, Comisión Ambiental Metropolitana*. Disponible en:
<http://www.sma.df.gob.mx/simat/pdf/avances.pdf>
- 50 EUM-SDS (1994) Contaminación atmosférica. Especificaciones sobre protección ambiental que deben reunir los combustibles fósiles líquidos y gaseosos que se usan en fuentes fijas y móviles. *Estados Unidos Mexicanos, Secretaría de Desarrollo Social* NOM-086-SEMARNAT-1994. Diario Oficial de la Federación. México. (2/12/94).
- 51 EUM-SEMARNAT (2006) Norma Oficial Mexicana NOM-086-SEMARNAT-SENER-SCFI-2005. Especificaciones de los combustibles fósiles para la protección ambiental. Diario Oficial de la Federación. México. (30/01/06). Disponible en:
http://www.semarnat.gob.mx/ssfna/acercaSSFNA/PW/CD_NOMS/noms_proy_nmx_semarnat/NOM_ATMOS_FUEN_FIJAS_ECOL/NOM_086_SEMAR_SENER_SCFI_05_30ENE06.pdf
- 52 Eweis J, Chang DPY, Schroeder ED (1997) Meeting the challenge of MTBE biodegradation. In: *Proceedings of the 90th Annual Meeting & Exhibition, AWMA*, June 8-13, Toronto, Ontario, Canada.
- 53 Fayolle F, Hernández G, Le Roux F, Vandecasteele JP (1998) Isolation of two aerobic bacterial strains that degrade efficiently ethyl *t*-butyl ether (ETBE). *Biotechnol. Lett.* **20**(3):283-286.
- 54 Fayolle F, Vandecasteele JP, Monot F (2001) Microbial degradation and fate in the environment of methyl *tert*-butyl ether and related fuel oxygenates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**:339-349.
- 55 Faulk RO, Gray JS (2001) Salem revisited: updating the MTBE controversy. *Environ. Forensics* **2**:29-59.
- 56 Finneran KT, Lovley DR (2001) Anaerobic degradation of methyl *tert*-butyl ether (MTBE) and *tert*-butyl alcohol (TBA). *Environ. Sci. Technol.* **35**(9):1785-1790.
- 57 Fiorenza S, Rifai HS (2003) Review of MTBE biodegradation and bioremediation. *Biorem. J.* **7**(1):1-35.
- 58 Fisher A, Oehm C, Michael Selle, Werner P (2005) Biotic and abiotic transformations of methyl tertiary butyl ether (MTBE). *Environ. Sci. & Pollut. Res.* **12**(6):381-386.

- 59 Fortin NY, Deshusses MA (1999a) Treatment of methyl *tert*-butyl ether vapors in biotrickling filters. 1. Reactor startup, steady-state performance, and culture characteristics. *Environ. Sci. Technol.* **33**(17):2980-2986.
- 60 Fortin NY, Deshusses MA (1999b) Treatment of methyl *tert*-butyl ether vapors in biotrickling filters. 2. Analysis of the rate-limiting step and behavior under transient conditions. *Environ. Sci. Technol.* **33**(17):2987-2991.
- 61 Fortin NY, Morales M, Nakagawa Y, Focht DD, Deshusses MA (2001) Methyl *tert*-butyl ether (MTBE) degradation by a microbial consortium. *Environ. Microbiol.* **3**(6):407-416.
- 62 François A, Mathis H, Godefroy D, Piveteau P, Fayolle F, Monot F (2002) Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether and other fuel oxygenates by a new strain, *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(6):2754-2762.
- 63 François A, Garnier L, Mathis H, Fayolle F, Monot F (2003) Roles of *tert*-butyl formate, *tert*-butyl alcohol and acetone in the regulation of methyl *tert*-butyl ether degradation by *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**(2-3):256-262.
- 64 Fujiwara Y, Kinoshita T, Sato H, Kojima I (1984) Biodegradation and bioconcentration of alkyl ethers. *Yukagaku* **33**:111–114.
- 65 Gams W, Anderson TH, Domsch KH (1980) Compendium of Soil Fungi. Two volumes. Academic Press, New York.
- 66 García-Peña EI, Hernández S, Favela-Torres E, Auria R, Revah S (2001) Toluene biofiltration by the fungus *Scedosporium apiospermum* TB1. *Biotechnol. Bioeng.* **76**(1):61-69.
- 67 Garfías y Ayala FJ, Díaz-Gutierrez L (2003) Gasolinas oxigenadas. La experiencia mexicana. *Fondo de Cultura Económica*. ISBN 968-16-6838-3. México, D.F.
- 68 Garnier PM, Auria R, Augur C, Revah S (1999) Cometabolic biodegradation of methyl *t*-butyl ether by *Pseudomonas aeruginosa* grown on pentane. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**:498-503.
- 69 Garnier PM, Auria R, Augur C, Revah S (2000) Cometabolic biodegradation of methyl *tert*-butyl ether by a soil consortium: effect of components present in gasoline. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **46**:79-84.
- 70 Grady CPL Jr (1985) Biodegradation: Its measurement and microbiological basis. *Biotechnol. Bioeng.* **27**(5):660-674.
- 71 GSP (Gasolina sin plomo...”Lo bueno, lo malo y lo feo”) Consulta en Internet. <http://www.fim.utp.ac.pa/Revista/vol1/gasolina.html> Consultada (14/09/05)

- 72 Hanson JR, Ackerman CE, Scow KM (1999) Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether by a bacterial pure culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(11):4788-4792.
- 73 Hardison LK, Curry SS, Ciuffetti LM, Hyman MR (1997) Metabolism of diethyl ether and cometabolism of methyl *tert*-butyl ether by a filamentous fungus, a *Graphium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(8):3059-3067.
- 74 Hatzinger PB, McClay K, Vainberg S, Tugusheva M, Condee CW, Steffan RJ (2001) Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether by a pure bacterial culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(12):5601-5607.
- 75 Hernández Pérez G, Fayolle F, Vandecasteele JP (2001) Biodegradation of ethyl *t*-butyl ether (ETBE), methyl *t*-butyl ether (MTBE) and *t*-amyl methyl ether (TAME) by *Gordonia terrae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**:117-121.
- 76 Hong JY, Yang CS, Lee M, Wang YY, Huang WQ, Tan Y, Patten CJ, Bondoc FY. (1997) Role of cytochromes P450 in the metabolism of methyl *tert*-butyl ether in human livers. *Arch. Toxicol.* **71**:266-269.
- 77 Horan CM, Brown EJ (1995) Biodegradation and inhibitory effects of methyl tertiary butyl ether (MTBE) added to microbial consortia. In: *Proceedings of the 10th Annual Conference on Hazardous Waste Research*, May 23-24, Manhattan, Kansas State University, USA.
- 78 Hunt R (1982) *Plant Growth Curves*. Arnold E (Publishers) Limited. 1ª Edición. London, Great Britain.
- 79 Hyman M, Kwon P, Williamson K, O'Reilly K (1998) Cometabolism of MTBE by alkane-utilizing microorganisms. In: Wickramanayake GB, Hinchey RE, eds. *Natural attenuation of chlorinated and recalcitrant compounds*, Columbus, Ohio, pp 321–326.
- 80 Hyman M, O'Reilly K (1999) Physiological and enzymatic features of MTBE-degrading bacteria. In: Alleman BC, Leeson A, eds. *In situ* bioremediation of petroleum hydrocarbon and other organic compounds, Columbus, Ohio, pp 7–12.
- 81 Hyman M, Taylor C, O'Reilly K (2000) Cometabolic degradation of MTBE by iso-alkane-utilizing bacteria from gasoline-impacted soils. In: Wickramanayake GB, Gavaskar AR, Allegan BC, Magar VS, eds. *Bioremediation and phytoremediation of chlorinated and recalcitrant compounds*, Columbus OH, pp 149–155.
- 82 IARC (1999a) IARC Monographs. Preamble to Monographs. The International Agency for Research on Cancer. Disponible en: <http://monographs.iarc.fr/monoeval/preamble.html>
Consultada (1/07/05)

- 83 IARC (1999b) Methyl tert-butyl ether (group 3). Summary of Data reported and evaluation. The International Agency for Research on Cancer Monographs. Programme on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. **73**:339. Disponible en <http://www.cie.iarc.fr/htdocs/monographs/vol73/73-13.html> Consultada (1/07/05)
- 84 IARC (2004) Formaldehyde (group 1). Summary of Data reported and evaluation. The International Agency for Research on Cancer Monographs. Programme on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. **88** (en preparación). Disponible en <http://monographs.iarc.fr/ENG/Meetings/88-formaldehyde.pdf> Consultada (25/09/06)
- 85 Jensen HM, Arvin E (1990) Solubility and degradability of the gasoline additive MTBE, methyl-*tert*-butyl ether, and gasoline compounds in water. In: Arendt F, Hinsenveld M, van den Brink WJ, eds. Contaminated Soil '90, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 445–448.
- 86 Johnson EL, Smith CA, O'Reilly KT, Hyman MR (2004) Induction of methyl tertiary butyl ether (MTBE)-oxidizing activity in *Mycobacterium vaccae* JOB5 by MTBE. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(2):1023-1030.
- 87 Kane SR, Beller HR, Legler TC, Koester CJ, Pinkart HC, Halden RU, Happel AM (2001) Aerobic biodegradation of methyl *tert*-butyl ether by aquifer bacteria from leaking underground storage tank sites. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(12):5824-5829.
- 88 Karlson U, Dwyer DF, Hooper SW, Moore ERB, Timmis KN, Eltis LD (1993) Two independently regulated cytochromes P-450 in a *Rhodococcus rhodochrous* strain that degrades 2-ethoxyphenol and 4-methoxybenzoate. *J. Bacteriol.* **175**(5):1467-1474.
- 89 Keller AA, Fernández L, Hitz S, Kun H, Peterson A, Smith B, Yoshioka M (1998) An integral cost-benefit analysis of gasoline formulations meeting California phase II reformulated gasoline requirements. *Report to the Governor of California UC TSR&TP.*
- 90 Keller AA, Fernández L (1999) Cost benefit considerations for the introduction of gasoline additives such as MTBE. In: *Proceedings of the International Congress on Ecosystem Health*, August 15-20, Sacramento, CA, USA.
- 91 Keller AA, Bierwagen BG (2001) Hydrophobic hollow fiber membranes for treating MTBE-contaminated water. *Environ. Sci. Technol.* **35**(9):1875-1879.
- 92 Kennes C, Veiga MC (2004) Fungal biocatalysts in the biofiltration of VOC-polluted air. *J. Biotechnol.* **113**:305-319.
- 93 Kharoune M, Bouagache L, Pauss A, Lebeault JM (1997) Biological and photochemical treatment of the unleaded gasoline oxygenates: MTBE, ETBE and TAME. In: *Proceedings of the International Symposium on Environmental Biotechnology*, April 21-24, Oostende, Belgium.

- 94 Kim DY, Rhee YH (2003) Biodegradation of microbial and synthetic polyesters by fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**:300-308.
- 95 Kharoune M, Kharoune L, Lebeault JM, Pauss A (2002) Aerobic degradation of ethyl-*tert*-butyl ether by a microbial consortium: selection and evaluation of biodegradation ability. *Environ. Toxicol. Chem.* **21**(10):2052–2058.
- 96 Koenigsberg S, Sandefur C, Mahaffey W, Deshusses M, Fortin N (1999) Peroxygen mediated bioremediation of MTBE. In: *In Situ Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons and Other Organic Compounds*, eds. Alleman B, Leeson A, eds, pp. 3–18, Columbus, OH, USA.
- 97 Kolhatkar R, Kuder T, Philip P, Allen J, Wilson JT (2002) Use of compound-specific stable carbon isotope analyses to demonstrate anaerobic biodegradation of MTBE in groundwater at a gasoline release site. *Environ. Sci. Technol.* **36**(23):5139-5146.
- 98 Kropp KG, Mormile MR, Suflita JM (2000) Anaerobic Biodegradation of MTBE and alternative gasoline oxygenates. Presented at the MTBE Biodegradation Workshop, Cincinnati, OH, February 1-3.
- 99 Landmeyer JE, Chapelle FH, Bradley PM, Pankow JF, Church CD, Tratnyek PG (1998) Fate of MTBE relative to benzene in a gasoline-contaminated aquifer (1993–98). *Ground Water Monit. Remediat.* **Fall**:93–102.
- 100 Landmeyer JE, Chapelle FH, Herlong HH, Bradley PM (2001) Methyl *tert*-butyl ether biodegradation by indigenous aquifer microorganisms under natural and artificial oxic conditions. *Environ. Sci. Technol.* **35**(6):1118-1126.
- 101 Leethem JT (2001) *In situ* chemical oxidation of MTBE and BTEX in soil and groundwater: a case study. *Contaminated Soil Sediment Water* **Spring. Special Issue**:54-58.
- 102 Liu CY, Speitel GE Jr, Georgiou G (2001) Kinetics of methyl *t*-butyl ether cometabolism at low concentrations by pure culture of butane-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(5):2197-2201.
- 103 López-Munguía A, Saab J (1999) Gasohol: un asunto controversial. *La Jornada. Lunes en la Ciencia.* (24/05/99). Disponible en: <http://www.jornada.unam.mx/1999/05/24/cien-gasohol.html>
- 104 López V (Abril 2002). Formación potencial de ozono en la zona metropolitana de la Cd. de México por reformación de gasolinas. ESIA, IPN Clasif 7526 México D.F. p. 94-117
- 105 Lovley DR, Coates JD, Blunt-Harris EL, Phillips EJP, Woodward JC (1996) Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature* **382**:445–448.

- 106 Manzanares L, Muñoz L, Romero C, Nevarez V, Ramírez E, Delgado M, Keer A (2001) Monitoring of MTBE as an ambient air pollutant in service stations of Chihuahua City. In: *Proceedings of the 94th Annual Meeting & Exhibition. AWMA*, June 24-28, Orlando, Florida, USA. Paper 689.
- 107 Meré D, Córdoba M (2006) Diversifican uso de la caña. *Reforma. Negocios*. (24/01/06). Disponible en:
<http://presidencia.gob.mx/buenasnoticias/?contenido=23073&pagina=68>
- 108 Meynell GG, Meynell E (1970) *Theory and Practice in Experimental Bacteriology*. 2da. Edición. Univ. Cambridge. 346 p.
- 109 Mo K, Lora CO, Wanken A, Kulpa CF (1995) Biodegradation of methyl *t*-butyl ether by pure cultures. Abstract, 95th ASM General Meeting, Vol. 95, p. 408.
- 110 Mo K, Lora CO, Wanken AE, Javanmardian M, Yang X, Kulpa CF (1997) Biodegradation of methyl *t*-butyl ether by pure bacterial cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**:69-72.
- 111 Molina-Gallegos V (1993) Estimación del índice de octano en gasolinas no comerciales por cromatografía de gas. Tesis de Licenciatura. Escuela de Ingeniería Química. *Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*. Puebla, Pue.
- 112 Morales M, Deshusses MA, Revah S (2000) Microcosm and column studies on the biodegradation of methyl *tert*-butyl ether (MTBE) in soil-water systems. In: *Proceedings of the 93th Annual Conference & Exhibition, AWMA*, June 18-22, Salt Lake City, Utah, USA.
- 113 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. *Biotechnol. Lett.* **26**:269-275.
- 114 Mormile MR, Liu S, Suflita JM (1994) Anaerobic biodegradation of gasoline oxygenates: extrapolation of information to multiple sites and redox conditions. *Environ. Sci. Technol.* **28**(9):1727-1732.
- 115 Nadim F, Zack P, Hoag GE, Liu S (2001) United States experience with gasoline additives. *Energy Policy* **29**:1-5.
- 116 Omura T (1999) Forty years of cytochrome P450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **266**:690-698.
- 117 Park K, Cowan RM (1997a) Biodegradation of gasoline oxygenates. In: *Proceedings of the Fourth International In situ and On-Site Bioremediation Symposium*, 1:17 Columbus OH, USA.

- 118 Park K, Cowan RM (1997b) Effects of oxygen and temperature on the biodegradation of MTBE. Preprints of *Extended Abstracts, Am. Chem. Soc.* **37**(1):421–424.
- 119 PDP (Polímeros derivados del petróleo) Consulta en Internet. Consultada (14/09/05) http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/39/html/sec_16.html
- 120 Piveteau P, Fayolle F, Vandecasteele JP, Monot F (2001) Biodegradation of *tert*-butyl alcohol and related xenobiotics by a methylotrophic bacterial isolate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**:369-373.
- 121 Pointing SB (2001) Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**:20-33.
- 122 Prenafeta-Boldú FX, Ballerstedt H, Gerritse J, Grotenhuis JTC (2004) Bioremediation of BTEX hydrocarbons: effect of soil inoculation with the toluene-growing fungus *Cladophialophora* sp. strain T1. *Biodegradation* **15**:59-65.
- 123 Prince RC (2000) Biodegradation of methyl tertiary-butyl ether (MTBE) and other fuel oxygenates. *Crit. Rev. Microbiol.* **26**(3):163-178.
- 124 Pruden A, Suidan MT, Venosa AD, Wilson GJ (2001) Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether under various substrate conditions. *Environ. Sci. Technol.* **35**(21):4235-4241.
- 125 Restrepo I (2006) Etanol vs. Gasolina. *La Jornada. Opinión.* (22/05/06). Disponible en: <http://www.jornada.unam.mx/2006/05/22/024a2pol.php>
- 126 Safarzadeh-Amiri A (2001) O₃/H₂O₂ treatment of methyl *tert*-butyl ether (MTBE) in contaminated waters. *Wat. Res.* **35**(15):3706-3714.
- 127 Salanitro JP, Díaz LA, Williams MP, Wisniewski HL (1994) Isolation of a bacterial culture that degrades methyl *t*-butyl ether. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**(7):2593-2596.
- 128 Salanitro JP (1995) Understanding the limitations of microbial metabolism of ethers used as fuel octane enhancers. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**(3):337-340.
- 129 Salanitro JP, Wisniewski HL, McAllister P (1996) Observation on the biodegradation and bioremediation potential of methyl *t*-butyl ether. In: *Proceedings of the 17th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry*, Abstract #601, Vol 17.
- 130 Salanitro JP, Chou CS, Wisniewski HL, Vipond TE (1998) Perspectives on MTBE biodegradation and the potential for *in situ* aquifer bioremediation. In: *Proceedings of the Southwestern Regional Conference of the Nacional Ground Water Association, MTBE and Perchlorate in Ground Water*, June 2-4, Anaheim, CA.

- 131 Salanitro JP, Johnson PC, Spinnler GE, Maner PM, Wisniewski HL, Bruce C (2000) Field-Scale demonstration of enhanced MTBE bioremediation through aquifer bioaugmentation and oxygenation. *Environ. Sci. Technol.* **34**(19):4152-4162.
- 132 Sánchez-Yáñez JM, García-Hernández D, Sosa-Aguirre CR (2006) Degradación de aromáticos por hongos de la podredumbre blanca. Minirevisión. Consulta en Internet. <http://www.monografias.com/trabajos32/degradacion-aromaticos/degradacion-aromaticos.shtml#top> Consultada (10/05/06).
- 133 Schifter I, Vera M, Díaz L, Guzmán E, Ramos F, López E (2001) Environmental implications on the oxygenation of gasoline with ethanol in the Metropolitan area of Mexico City. *Environ. Sci. Technol.* **35**(10):1893-1901.
- 134 Schirmer M, Butler BJ, Church CD, Barker JF, Nadarajah N (2003) Laboratory evidence of MTBE biodegradation in Borden aquifer material. *J. Contam. Hydrol.* **60**(3-4):229-249.
- 135 Sedran MA, Pruden A, Wilson GJ, Suidan MT, Venosa AD (2002) Effect of BTEX on degradation of MTBE and TBA by mixed bacterial consortium. *J. Environ. Eng.* **128**(9):830-835.
- 136 Shields D, Sarmiento Torres R (2006) La era de los bioenergéticos. *Energía a Debate* Junio 2006. Disponible en: http://www.energiaadebate.com.mx/Articulos/junio_2006/la_era.htm
- 137 Smith CA, O'Reilly KT, Hyman MR (2003a) Characterization of the initial reactions during the cometabolic oxidation of methyl *tert*-butyl ether by propane-grown *Mycobacterium vaccae* JOB5. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(2):796-804.
- 138 Smith CA, O'Reilly KT, Hyman MR (2003b) Cometabolism of methyl tertiary butyl ether and gaseous *n*-alkanes by *Pseudomonas mendocina* KR-1 grown on C5 to C8 *n*-alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(12):7385-7394.
- 139 Smith CA, Hyman MR (2004) Oxidation of methyl *tert*-butyl ether by alkane hydroxylase in dicyclopropylketone-induced and *n*-octane-grown *Pseudomonas putida* GPo1. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(8):4544-4550.
- 140 Solórzano JL, Rizzo AC, Millioli VS, Ururahy A, de Moura MI, Santos R (2002) Petroleum degradation by filamentous fungi. In: *Proceedings of the 9th Annual International Petroleum Environmental Conference*, October 22-25, Albuquerque, NM., U.S.
- 141 Somsamak P, Cowan R, Haggblom MM (2001) Anaerobic biotransformation of fuel oxygenates under sulfate-reducing conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.* **37**(3):259-264.

- 142 Spigno G, Pagella C, Fumi MD, Molteni R, de Faveri DM (2003) VOCs removal from waste gases: gas-phase bioreactor for the abatement of hexane by *Aspergillus niger*. *Chem. Eng. Sci.* **58**:739-746.
- 143 Stefan MI, Mack J, Bolton JR (2000) Degradation pathways during the treatment of methyl *tert*-butyl ether by the UV/H₂O₂ process. *Environ. Sci. Technol.* **34**(4):650-658.
- 144 Steffan RJ, McClay K, Vainberg S, Condee CW, Zhang D (1997) Biodegradation of the gasoline oxygenates methyl *tert*-butyl ether, ethyl *tert*-butyl ether and *tert*-amyl methyl ether by propane-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(11):4216-4222.
- 145 Stern BR, Kneiss JJ (1997) Methyl tertiary-butyl ether (MTBE): use as an oxygenate in fuels. *J. Appl. Toxicol.* **17**(S1):S1-S2.
- 146 Stocking AJ, Deeb RA, Flores AE, Stringfellow W, Talley J, Brownell R, Kavanaugh MC (2000) Bioremediation of MTBE: a review from a practical perspective. *Biodegradation* **11**:187-201.
- 147 Stringfellow WT, Oh KC (2002) Initiation of MTBE biotreatment in fluidized-bed bioreactors. *J. Environ. Eng.* **128**(9):852-861.
- 148 Stupperich E, Konle R (1993) Corrinoid-dependent methyl transfer reactions are involved in methanol and 3,4-dimethoxybenzoate metabolism by *Sporomusa ovata*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3110-3116.
- 149 Suflita JM, Mormile MR (1993) Anaerobic biodegradation of known and potential gasoline oxygenates in a terrestrial subsurface. *Environ. Sci. Technol.* **27**(5):976-978.
- 150 Teorema (2006) Inviabile para PEMEX cumplir ley energética. *Teorema Técnico Ambiental*. Disponible en: http://www.teorema.com.mx/articulos.php?id_sec=51&id_art=1790&id_ejemplar=0
- 151 Thomas VM (1995) The elimination of lead in gasoline. *Annu. Rev. Energy Environ.* **20**:301-324.
- 152 U.S. EPA (1997) Drinking water advisory: consumer acceptability advice and health effects analysis on methyl tertiary-butyl ether (MtBE). Office of Water. *United States Environmental Protection Agency*. EPA 822-F-97-009. Disponible en: <http://www.epa.gov/OUST/mtbe/index.html>
- 153 U.S. EPA (1998a) MTBE Fact Sheet #1. Overview. Office of Underground Storage Tanks. *United States Environmental Protection Agency*, EPA 510-F-97-014. Disponible en: <http://www.epa.gov/oust/>

- 154 U.S. EPA (1998b) MTBE Fact Sheet #2. Remediation of MTBE contaminated soil and groundwater. Office of Underground Storage Tanks. *United States Environmental Protection Agency*, EPA 510-F-97-015. Disponible en: <http://www.epa.gov/oust/mtbe>
- 155 U.S. EPA (1998c) Oxygenates in water: critical information and research needs. Office of Research and Development. *United States Environmental Protection Agency*, EPA/600/R-98/048. Disponible en: <http://www.epa.gov/>
- 156 U.S. EPA (2000) Natural Attenuation of MTBE in the subsurface under methanogenic conditions. *United States Environmental Protection Agency*, EPA/600/R-00/006. Disponible en: <http://www.epa.gov/>
- 157 U.S. EPA (2004) Technologies for treating MtBE and other fuel oxygenates. Office of Solid waste and Emergency Response. *United States Environmental Protection Agency*, EPA 542-R-04-009. Disponible en: <http://www.epa.gov/oust/mtbe/mtberem.html>
- 158 Vainberg S, Togna AP, Sutton PM, Steffan RJ (2002) Treatment of MTBE-contaminated water in fluidized bed bioreactor. *J. Environ. Eng.* **128**(9):842-851.
- 159 van den Brink HJM, van Gorcom RFM, van den Hondel CA, Punt PJ (1998) Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Genet. Biol.* **23**:1-17.
- 160 van Groenestijn JW, van Heiningen WNM, Kraakman NJR (2001) Biofilters based on the action of fungi. *Wat. Sci. Technol.* **44**(9):227-232.
- 161 Vane LM, Álvarez FR, Mullins B (2001) Removal of methyl *tert*-butyl ether from water by pervaporation: bench- and pilot-scale evaluations. *Environ. Sci. Technol.* **35**(2):391-397.
- 162 White GF, Russell NJ, Tidswell EC (1996) Bacterial scission of ether bonds. *Microbiol. Rev.* **60**(1):216-232.
- 163 Wilson GJ, Richter AP, Suidan MT, Venosa AD (2001) Aerobic biodegradation of gasoline oxygenates MTBE and TBA. *Water Sci. Technol.* **43**(2):277-284.
- 164 Wilson GJ, Pruden A, Suidan MT, Venosa AD (2002a) Biodegradation kinetics of MTBE in laboratory batch and continuous flow reactors. *J. Environ. Eng.* **128**(9):824-829.
- 165 Wilson RD, Mackay DM, Scow KM (2002b) *In situ* MTBE biodegradation supported by diffusive oxygen release. *Environ. Sci. Technol.* **36**(2):190-199.
- 166 Woodward RE (2001) Management of oxygenated fuels in the United States and the European Union. *Contaminated Soil Sediment Water*. Spring. **Special Issue**:85-86.

- 167 Yeh CK, Novak JT (1994) Anaerobic biodegradation of gasoline oxygenates in soils. *Water Environ. Res.* **66**(5):744-752.
- 168 Yeh CK, Novak JT (1995) The effect of hydrogen peroxide on the degradation of methyl and ethyl *tert*-butyl ether in soils. *Water Environ. Res.* **67**(5):828-834.
- 169 Zhang Q, Davis LC, Erickson LE (2001) Transport of methyl *tert*-butyl ether through alfalfa plants. *Environ. Sci. Technol.* **35**(4):725-731.
- 170 Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, Van't Riet K (1990) Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(6): 1875-1881.

APÉNDICE A

Estimación del rendimiento mediante la producción de CO₂

La composición elemental de un microorganismo dado durante un cultivo no se modifica mayormente y se ha encontrado que las composiciones elementales de distintos tipos de microorganismos (bacterias y hongos) son semejantes. De este modo, se puede definir un “microorganismo promedio” como aquél cuya composición es (% p/p): C = 46.5; H = 6.49; O = 31.0; N = 10.85, siendo el contenido de sales aproximadamente 5%. Es importante recalcar que si bien la composición elemental de la biomasa se mantiene constante durante el cultivo, no ocurre lo mismo con la composición macromolecular, esto es: proteínas, ácidos nucleicos, etc., la cual puede variar sensiblemente.

Teniendo en cuenta la composición media anterior, es posible escribir la “fórmula mínima” de un microorganismo promedio como: CH_{1.79}O_{0.5}N_{0.2} (en la que está representado el 95% p/p de la biomasa) y con fines netamente prácticos definir “un C-mol de biomasa” como la cantidad de biomasa que contiene un átomo gramo de carbono.

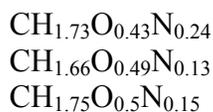
Luego:

$$1 \text{ C-mol de biomasa} = \frac{12 + 1.79 + 16 \times 0.5 + 14 \times 0.2}{0.95} = 25.8 \text{ g}$$

Por lo tanto hay 12 g de C por cada 25.8 g de biomasa.

(Texto tomado de Ertola *et al.* 1994)

La fórmula mínima determinada arriba, es muy semejante al promedio de fórmulas determinadas para levaduras*:



Promedio: CH_{1.71}O_{0.47}N_{0.17}

* Datos de Atkinson & Mavituna 1991

Para la estimación de rendimientos mediante la producción de CO_2 , se asumió que el carbono no mineralizado se incorpora como biomasa. Puesto que esta suposición puede no ser correcta ya que pudo existir formación de intermediarios no detectados, los rendimientos reales serían menores y por lo tanto los valores estimados representarían los máximos rendimientos que podrían lograrse con los sustratos estudiados.

Ya que conocemos la cantidad inicial y final de sustrato en cada experimento (el carbono inicial y final), y el carbono mineralizado como CO_2 , podemos calcular el carbono que suponemos se integró como biomasa, y con la relación anterior, estimar la cantidad de biomasa que se formaría y de este valor calcular el rendimiento.

Se prefirió utilizar el método anterior de estimación del rendimiento que la medición directa de proteína, ya que en varios casos la cantidad de proteína al final del experimento fue igual o aún menor a la inicial, esto es, hubo un decremento en la cantidad de biomasa. Si tomamos solamente los datos en los que sí hubo un incremento en la concentración de proteína, se pudo estimar que para el MTBE el rendimiento fue de alrededor de 0.09 g biomasa/g MTBE y para TBA de 0.2 g biomasa/g TBA.

Methyl *tert*-butyl ether and *tert*-butyl alcohol degradation by *Fusarium solani*

Miguel Magaña-Reyes¹, Marcia Morales² & Sergio Revah^{1,*}

¹Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Ingeniería de Procesos, Av. San Rafael Atlixco No. 186, C.P. 09340, México D.F., México

²Instituto Mexicano del Petróleo, Programa de Procesos y Reactores, Eje Central Lázaro Cárdenas 152, C.P. 07730, México D.F., México

*Author for correspondence (Fax: + 52-55-58046407; E-mail: srevah@xanum.uam.mx)

Received 9 June 2005; Revisions requested 16 June 2005; Revisions received 9 September 2005; Accepted 9 September 2005

Key words: biodegradation, *Fusarium solani*, methyl *tert*-butyl ether, oxygenated additives

Abstract

Fusarium solani degraded methyl *tert*-butyl ether (MTBE) and other oxygenated compounds from gasoline including *tert*-butyl alcohol (TBA). The maximum degradation rate of MTBE was 16 mg protein h and 46 mg/g protein h for TBA. The culture transformed 77% of the total carbon to ¹⁴CO₂. The estimated yield for MTBE was 0.18 g dry wt/g MTBE.

Introduction

Since the early 1980s unleaded gasolines in many countries have contained oxygenated compounds to improve combustion and reduce polluting emissions. Methyl *tert*-butyl ether (MTBE) is the most frequently used because of its favorable properties and low cost. MTBE, however, is very recalcitrant and pollution from leaking tanks and spills has been widely reported (Fiorenza & Rifai 2003). *Tert*-butyl alcohol (TBA) contamination of drinking water merits similar consideration due to its usage as a fuel oxygenate and significance as an intermediate in microbial degradation of MTBE (Bradley *et al.* 1999, Kane *et al.* 2001). Other oxygenates include ethyl *tert*-butyl ether (ETBE) and *tert*-amyl methyl ether (TAME).

The aerobic co-metabolism of MTBE (Steffan *et al.* 1997, Garnier *et al.* 1999, Smith *et al.* 2003, Morales *et al.* 2004) and aerobic biodegradation of MTBE (Salanitro *et al.* 1994, Bradley *et al.* 1999, Fortin & Deshusses 1999) have been extensively studied in bacteria, TBA, 2-methyl-2-hydroxy-1-propanol (MHP) and 2-hydroxy

isobutyric acid (HIBA) being intermediates in its degradation.

The use of filamentous fungi in bioremediation has been limited as compared to bacteria. They have a strong potential as they can grow and produce a wide variety of enzymes in environmental conditions with low pH and low water activity. However a wide diversity of fungal genera can degrade a broad spectrum of pollutants. (Bennett & Faison 1997). Only one publication reports the use of a fungus for biodegradation of MTBE. Hardison *et al.* (1997) showed that *Graphium* sp. can degrade MTBE co-metabolically with *n*-butane with the accumulation of TBA.

The main objective of this study was to characterize the biodegradation of the main ether-based oxygenates of gasoline (MTBE, ETBE and TAME) by *Fusarium solani*.

Materials and methods

Chemicals. Uniformly labeled [¹⁴C]MTBE in ethanol, spec. act. 5.8 mCi/mmol, was from Perkin

Elmer Life Sciences Inc. (Boston, MA, USA). Scintillation liquid ScintiVerse II was from Fisher Scientific (Fair Lawn, New Jersey, USA). MHP was prepared at the Department of Chemistry by Eduardo González and had a purity >85% by NMR. All other chemicals were obtained from commercial suppliers and were of the highest available purity.

Fungal culture. A non-axenic fungal culture consisting of *Fusarium* sp. and bacteria was obtained from the biofiltration experiments reported by Arriaga & Revah (2005). For inoculation, the culture was allowed to settle and the pellets were dispersed with a manual glass homogenizer. A pure fungal culture has been isolated and was classified and deposited at the Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht, The Netherlands as *Fusarium solani* B1, CBS 117476.

Kinetic experiments. Volatile substrate degradation experiments were done in 60, 160 or 600 ml closed reactors (microcosms), sealed with Mininert valves under aerobic conditions. Each bottle contained 5, 10 or 25 ml of the mineral medium described by Arriaga & Revah (2005). The medium was sterilized at 121 °C for 15 min. The pH was adjusted to 4.5 and inoculated with 10% (v/v) of the microbial suspension. The bottles were incubated at 30 °C and shake at 150 rpm. All the experiments were conducted in duplicate. Substrate, O₂ and CO₂ concentrations were measured from a 100 µl headspace gas sample. Substrate consumption or CO₂ production rates were fitted with the Gompertz model as previously described (Acuña *et al.* 1999). Experiments for determining air/mineral medium partition coefficients yielded the following dimensionless values: MTBE (0.045), TBA (0.0009), ETBE (0.063) and TAME (0.050).

Mineralization experiments. The experiment was performed in 160 ml flasks added with radiolabeled [¹⁴C]MTBE. The initial radioactivity was 1.66 × 10⁻⁴ mCi. Incubation was performed under the same conditions as the kinetic experiments. The released ¹⁴CO₂ was analyzed as described by Fortin *et al.* (2001).

Analytical techniques

MTBE, TBA, ETBE, TAME and *n*-hexane were quantified from the headspace by GC-FID,

(Hewlett Packard 5890 series II, USA). The column used was a 30 m methyl silicon ID 0.32 mm and 0.250 µm film thickness (Quadrex Corp. USA) with nitrogen at 1.5 ml/min. The oven temperature was 40 °C, injector 180 °C, and detector 210 °C. Headspace CO₂ and O₂ were analyzed by gas chromatography (Garnier *et al.* 1999). HIBA and MHP degradation was estimated by CO₂ production and O₂ consumption. Protein was measured with the Lowry method.

Results and discussion

Figure 1 shows a decrease of 89% in the concentration of MTBE after five additions of hexane, yielding a co-metabolic coefficient of 0.1 mg MTBE/mg hexane. This value was lower than the data reported by Garnier *et al.* (1999) with *Pseudomonas aeruginosa* (0.7 mg MTBE/mg pentane) or that by Morales *et al.* (2004) with a microbial consortium (1 mg MTBE/mg pentane and 0.5–0.8 mg MTBE/mg hexane).

After 300 h incubation, hexane addition was not repeated and MTBE degradation stopped, its concentration remaining constant thereafter. The residual O₂ concentration in the headspace was 10% which rules out O₂ limitation. No TBA accumulation was observed. In another experiment, (not shown), no significant degradation occurred within a similar period when only MTBE was added. The degradation rate was

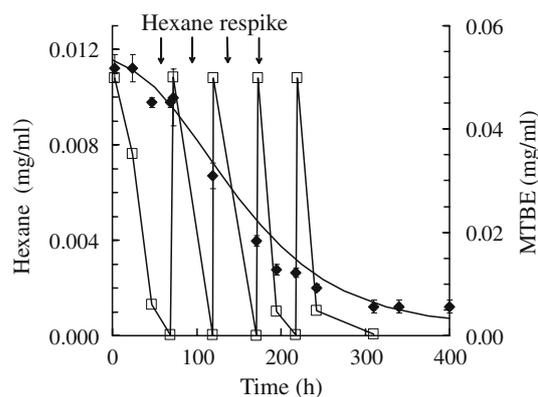


Fig. 1. Co-metabolic degradation of MTBE with *n*-hexane by non-axenic fungal culture. Microcosms were respiked with 10 µl of *n*-hexane each time. □, Hexane (in gas phase); ♦, MTBE (in liquid phase).

3.7 mg MTBE/g protein h (0.7 nmol/mg protein min, $r^2=0.994$), which was about twice the maximum rate reported for the MTBE cometabolic degradation with *Graphium* sp. (Hardison *et al.* 1997), but lower than the values reported for bacteria. Steffan *et al.* (1997) observed a co-metabolic degradation rate with propane of 9.2 nmol/mg protein min with the bacterium ENV 421. Garnier *et al.* (1999) calculated a rate of 3.9 nmol/mg protein min by *Pseudomonas aeruginosa* with *n*-pentane while Smith *et al.* (2003) determined a co-metabolic rate by *Pseudomonas mendocina* KR-1 with *n*-pentane of 35.3 nmol/mg protein min and an average rate with *n*-alkanes (C_6 – C_7) of 61.1 nmol/mg protein min. In this case, the authors observed TBA accumulation. For a microbial consortium, Morales *et al.* (2004) reported co-metabolic MTBE degradation rates of 49, 12, and 32 nmol/mg protein with pentane, hexane, and isooctane, respectively, TBA accumulation was found.

To induce non-co-metabolic MTBE degradation, the culture was inoculated in liquid mineral medium (pH 4.5) and adapted independently to MTBE and TBA through successive transfers for three months. The culture was unable to degrade MTBE when added alone. However, the culture grown with TBA initiated its degradation in the same period as seen in Figure 2. The maximum degradation rate was 15.9 mg/g protein h (3.57 nmol/mg protein min, $r^2=0.982$). The carbon balance showed that 61.6% of the carbon was transformed to CO_2 . Afterwards, the degra-

dition of MTBE by the culture grown in TBA was tested and was shown to consume 98% of the initial MTBE in 260 h (Figure 2) after an adaptation period of around 190 h. Between 190 and 260 h, the degradation rate of MTBE was 10.1 mg/g protein h (1.91 nmol/mg protein min, $r^2=0.985$). The final protein concentration showed a negligible amount of biomass produced with both substrates.

Pellets grown with TBA or MTBE in liquid medium were inoculated on solid media. Cultures grown on YPG agar at pH 4.5, nutritive agar at pH 7.0 and mineral medium plates at pH 4.5 incubated in vapors of TBA or MTBE, showed colonies of a fungus which was identified as *Fusarium solani*. Few bacteria were observed under the microscope in the liquid cultures and few bacterial colonies grew after a vigorous homogenization of the pellets on YPGA at pH 4.5 and nutritive agar at pH 7.0. These bacteria were neither able to grow on MTBE nor on TBA either alone or by co-metabolism with hexane.

Determination of the degradation rate of TBA and MTBE

The oxidation rate of TBA and MTBE as a function of the initial concentration was studied in 60 ml microcosms containing 5 ml of mineral medium. As seen in Figure 3, the culture degraded TBA when added at initial volumes between 1 and 13 μ l (0.15–1.97 mg/ml in liquid phase) and MTBE between 1 and 8 μ l (0.1–0.8 mg/ml in

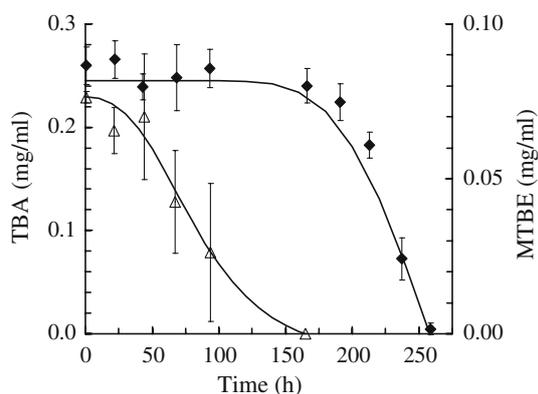


Fig. 2. Degradation of TBA and MTBE by the non-axenic fungal culture adapted for three months in TBA. \blacklozenge , MTBE; Δ TBA.

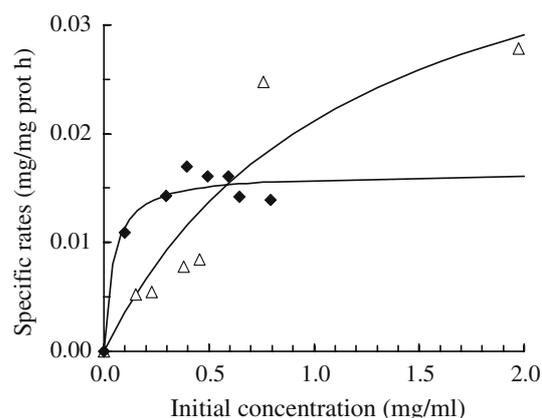


Fig. 3. Effect of TBA or MTBE concentration on the specific degradation rates by the non-axenic fungal culture. \blacklozenge , MTBE; Δ TBA.

liquid phase). TBA or MTBE were not degraded when added at initial volumes higher than 13 or 8 μl , respectively. The data was fitted to a Michaelis–Menten model. For TBA the V_m TBA was 46.3 mg TBA/g protein h (i.e. 10.4 nmol TBA/mg protein min, $r^2=0.915$) and the K_m TBA was 1.19 mg/ml. François *et al.* (2002) calculated a K_m TBA of 1.1 mM (0.082 mg/ml) by *Mycobacterium austroafricanum*. Specific affinity (V_m/K_m), for TBA degradation was 0.020 l/g dry wt. h (assuming a cell protein content of 50%). Mineralization, defined as the fraction of carbon recovered as CO_2 from TBA degradation, decreased when concentration was increased (from 96.6% for 0.15 mg/ml to 53.4% for 1.97 mg/ml), indicating that TBA assimilation was better at higher concentration. Nevertheless, final TBA degradation was lower at the highest concentrations (from 100% for 0.15 mg/ml in 235 h to 70.3% for 1.97 mg/ml in 500 h), due to O_2 concentration limitations in the headspace (<4%). Yield was determined from CO_2 production assuming that the non-mineralized carbon was incorporated as biomass (elemental formula $\text{CH}_{1.79}\text{O}_{0.5}\text{N}_{0.2}$ with 5% of salts). An average yield for TBA calculated with this relation was 0.36 g biomass/g TBA. François *et al.* (2002) calculated a yield for TBA of 0.61 g biomass/g TBA for *Mycobacterium austroafricanum*.

For MTBE, the V_m MTBE was 16.4 mg MTBE/g protein h (3.1 mol MTBE/mg protein. min, $r^2=0.949$) and the K_m MTBE was 0.042 mg/ml. Salanitro *et al.* (1994) observed a maximum degradation rate with the culture BC-1 of 34 mg/g dry wt.h (12.86 nmol/mg protein·min, assuming a cell protein content of 50%). Fortin & Deshusses (2001) reported a degradation rate with the F-consortium ranging from 18 to 277 mg/g dry wt. h (6.7–106.7 nmol/mg protein·min), and a K_m MTBE of 17 μM (0.0015 mg/ml). For *Fusarium solani*, a specific affinity for MTBE degradation was 0.19 l/g dry wt. h, 10 times higher than the TBA affinity. This is lower than the values reported earlier for bacteria (Fortin *et al.* 2001). The average yield calculated for MTBE was lower than the yield with TBA (0.18 g biomass/g MTBE) which was consistent with the data reported by other authors for bacteria or mixed cultures (Salanitro *et al.* 1994, Fortin & Deshusses 1999).

Mineralization experiments

The culture was tested with [^{14}C]MTBE to confirm the mineralization. Figure 4 shows that 77% of the total carbon was converted to $^{14}\text{CO}_2$. Slower degradation with the [^{14}C]MTBE was possibly due to the ethanol present as solvent for this molecule. This result is higher than the data reported for MTBE mineralization by some bacteria (Salanitro *et al.* 1994, Kane *et al.* 2001). Experiment with unlabeled MTBE showed that no MTBE or TBA remained after 500 h.

Degradation of other compounds

Fusarium solani was tested for its ability to degrade and mineralize the fuel oxygenates ETBE, TAME and the intermediates HIBA and MHP that have been reported in MTBE degradation. All substrates, except ETBE were degraded, suggesting specificity for the methoxy group. This result was consistent with the data reported by François *et al.* (2002). TAME was almost completely degraded (98.5%) in 72 h and 46.4% of the carbon was recovered as CO_2 . No intermediate accumulation was detected. The yield calculated for TAME was 0.54 g biomass/g TAME. MHP and HIBA degradation was shown indirectly by CO_2 production and O_2 consumption. Mineralization was 92.0% for MHP and 54.4% for HIBA.

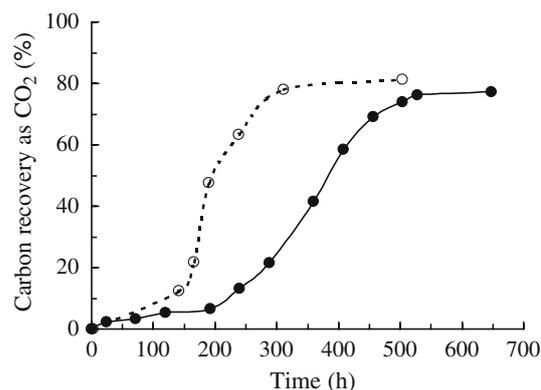


Fig. 4. Mineralization percentage of uniformly labeled [^{14}C]MTBE as CO_2 by the non-axenic fungal culture. Initial [^{14}C]MTBE 1.66×10^{-4} mCi ● $^{14}\text{CO}_2$, ○ Control with unlabeled CO_2 .

Conclusions

Our study shows that a non-axenic fungal culture consisting predominantly of *Fusarium solani* degraded the oxygenates TAME and MTBE, and the intermediates of the MTBE degradation pathway TBA, MPH and HIBA. The culture in hexane promoted the cometabolic degradation of MTBE. Growth in TBA induced MTBE degradation as a sole source of carbon and energy. This studies confirms the broad possibilities of fungi in degrading recalcitrant pollutants such as the fuel oxygenates.

Acknowledgements

This work was supported by research grants from CONACyT and Instituto Mexicano del Petróleo. FIES 01-VI-03. The authors appreciate the help of Dr. Eduardo González, Department of Chemistry, UAM-Iztapalapa.

References

- Acuña ME, Perez F, Auria R, Revah S (1999) Microbiological and kinetic aspects of a biofilter for the removal of toluene from waste gases. *Biotechnol. Bioeng.* **63**: 175–184.
- Arriaga S, Revah S (2005) Improving hexane removal by enhancing fungal development in a microbial consortium biofilter. *Biotechnol. Bioeng.* **90**: 107–115.
- Bennett JW, Faison BD (1997) Use of fungi in biodegradation. In: Hurst CJ, Knudsen GR, McInerney MJ, Stetzenbach LD & Walter MV, eds. *Manual of Environmental Microbiology*, Washington DC: ASM Press, pp. 758–765.
- Bradley PM, Landmeyer JE, Chapelle FH (1999) Aerobic mineralization of MTBE and *tert*-butyl alcohol by stream-bed sediment microorganisms. *Environ. Sci. Technol.* **33**: 1877–1879.
- Fiorenza S, Rifai HS (2003) Review of MTBE biodegradation and bioremediation. *Biorem. J.* **7**: 1–35.
- Fortin NY, Deshusses MA (1999) Treatment of methyl *tert*-butyl ether vapors in biotrickling filters. 1. Reactor startup, steady-state performance, and culture characteristics. *Environ. Sci. Technol.* **33**: 2980–2986.
- Fortin NY, Morales M, Nakagawa Y, Focht DD, Deshusses MA (2001) Methyl *tert*-butyl ether (MTBE) degradation by a microbial consortium. *Environ. Microbiol.* **3**: 407–416.
- François A, Mathis H, Godefroy D, Piveteau P, Fayolle F, Monot F (2002) Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether and other fuel oxygenates by a new strain, *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2754–2762.
- Garnier PM, Auria R, Augur C, Revah S (1999) Cometabolic biodegradation of methyl *t*-butyl ether by *Pseudomonas aeruginosa* grown on pentane. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 498–503.
- Hardison LK, Curry SS, Ciuffetti LM, Hyman MR (1997) Metabolism of diethyl ether and co-metabolism of methyl *tert*-butyl ether by a filamentous fungus, a *Graphium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3059–3067.
- Kane SR, Beller HR, Legler TC, Koester CJ, Pinkart HC, Halden RU, Happel AM (2001) Aerobic biodegradation of methyl *tert*-butyl ether by aquifer bacteria from leaking underground storage tank sites. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5824–5829.
- 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. *Biotechnol. Lett.* **26**: 269–275.
- Salanitro JP, Diaz LA, Williams MP, Wisniewski HL (1994) Isolation of a bacterial culture that degrades methyl *t*-butyl ether. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2593–2596.
- Smith CA, ÓReilly KT, Hyman MR (2003) Co-metabolism of methyl tertiary butyl ether and gaseous *n*-alkanes by *Pseudomonas mendocina* KR-1 grown on C5 to C8 *n*-alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 7385–7394.
- Steffan RJ, McClay K, Vainberg S, Condee CW, Zhang D (1997) Biodegradation of the gasoline oxygenates methyl *tert*-butyl ether, ethyl *tert*-butyl ether and *tert*-amyl methyl ether by propane-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4216–4222.

Iztapalapa, D.F. a 18 de Enero de 2006

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

“DEGRADACIÓN DE METIL *TERT*-BUTIL ÉTER (MTBE) Y OTROS
OXIGENANTES DE LA GASOLINA POR HONGOS
FILAMENTOSOS”

Que presentó

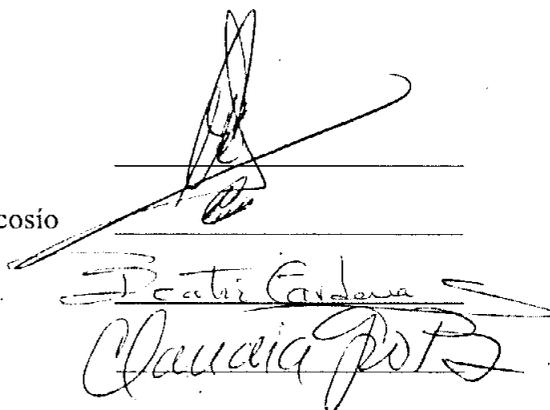
M. en B. MIGUEL MAGAÑA REYES

Comité Tutorial:

Director: Dr. Sergio Revah Moiseev
Asesor: Dra. Marcia Guadalupe Morales Ibarría
Asesor: Dra. Beatriz Cárdenas González

Jurado:

Presidente: Dr. Ernesto Favela Torres
Secretario: Dra. Araceli Tomasini Campocósio
Vocal: Dra. Beatriz Cárdenas González
Vocal: Dra. Claudia Guerrero Barajas



Handwritten signatures of the jury members over horizontal lines. The signatures are: a stylized signature for Ernesto Favela Torres, a signature for Araceli Tomasini Campocósio, a signature for Beatriz Cárdenas González, and a signature for Claudia Guerrero Barajas.