



Biodegradación de los componentes de mayor impacto en la gasolina

NORA ALEYDA GARCÍA GÓMEZ*, MARCO ANTONIO DE LA TORRE TORRES*, MA. TERESA GARZA GONZÁLEZ**, KARIM ACUÑA ASKAR*



Una de las mayores fuentes de contaminación ambiental responde al uso de la energía y al acelerado desarrollo industrial, que trae consigo el uso exhaustivo del petróleo y sus derivados, cuyos procesos de explotación y tratamiento están aunados a la liberación de compuestos que contaminan el medio ambiente.

La gasolina es uno de los derivados del petróleo, entre los componentes de la misma con mayor potencial de riesgo ambiental, por su fácil liberación al medio ambiente y amplia toxicidad carcinogénica, se encuentran el benceno, tolueno, etilbenceno y el total de xilenos (BTEX), también los compuestos oxigenantes ampliamente utilizados como el éter metil *t*-butílico (EMTB) y el etanol.¹

El EMTB es el compuesto oxigenante que más se utiliza en las gasolinas para elevar el índice de octanos y disminuir la emisión de gases contaminantes al ambiente. El EMTB y los BTEX han sido identificados como potencialmente carcinogéni-

cos^{2,3} y junto con el etanol, que es el segundo oxigenante en uso, tienen la capacidad de migrar a través del subsuelo y contaminar los mantos freáticos.⁴

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés) establece los siguientes límites máximos permisibles en agua potable en mg/L para BTEX: benceno, 0.005; tolueno, 1.0; etilbenceno, 0.7 y mezcla de xilenos, 10,⁵ y recomienda un intervalo máximo de 20 a 40 g/L de EMTB contenido en agua potable;⁶ mientras que los límites máximos permisibles establecidos por la Secretaría de Salud en México para BTEX en mg/L, son: benceno, 0.01; tolueno, 0.3; etilbenceno, 0.7 y mezcla de xilenos, 0.5.⁷

Estos compuestos son parcialmente biodegradables, pero la mayor parte de ellos permanece en el ambiente;⁸ por lo que es necesario desarrollar tecnologías útiles para la remoción de estos contaminantes de los diferentes recursos naturales a donde se extienden y evitar de esta manera al máximo el daño ambiental.

El empleo de microorganismos para la biorre-

El presente artículo está basado en la investigación "Evaluación de las cinéticas de biodegradación de los componentes de mayor impacto de la gasolina", galardonado con el Premio de Investigación UANL 2006 en la categoría de Ciencias Exactas, otorgado en sesión solemne del Consejo Universitario de la UANL, en septiembre de 2006.

*Laboratorio de Biorremediación Ambiental, Departamento de Microbiología Médica, Facultad de Medicina, UANL.

**Laboratorio de Biotecnología, Centro de Laboratorios Especializados (CELAES), Facultad de Ciencias Químicas, UANL.

mediación de sitios contaminados con hidrocarburos es una opción viable y ampliamente utilizada por ser una tecnología sencilla, de bajo costo y amigable con el medio ambiente.⁹

Materiales y métodos

Condiciones de aclimatación. El benceno, tolueno, etilbenceno, (o-, m-, y p-) xileno, así como el etanol y el EMTB fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (México) con 98% de pureza. El medio de BOD fue preparado con agua desionizada y mantenido en el reactor de aclimatación de biomasa de acuerdo a las siguientes concentraciones (mg/L):¹⁰ KH_2PO_4 , 17; K_2HPO_4 , 44; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 67; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 23; NH_4Cl , 3.4; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 40; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1. El medio concentrado (MC) fue preparado para resuspender las células bacterianas después de centrifugarlas y tuvo la siguiente composición: (g/L) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6; KH_2PO_4 , 3; NaCl , 1; NH_4Cl , 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; CaCl_2 , 0.011; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.001. El medio con sustratos (MCS) que fue preparado para los bioensayos experimentales consistió de MC y 30 mg/L de cada BTEX (10 mg/L de cada xileno) EMTB y etanol.

Esterilización de muestras. Los medios de BOD y MC fueron esterilizados a 121°C, a 15 psi por 15 minutos.

Aclimatación de los inóculos con enriquecimiento a Diesel, gasolina, EMTB, pentano y pentano-EMTB. Las biomasas fueron aclimatadas en cinco reactores de tipo batch, cada uno con un intervalo de aireación de 8.3-8.6 mg/L de oxígeno disuelto. La temperatura se mantuvo en un intervalo de 18-25°C y el pH de 7.0-7.5. Diariamente se alimentaron de la siguiente manera: reactor No. 1: 200 mg/L de Diesel; No. 2: 200 mg/L de gasolina; reactor No. 3: 148 mg/L de EMTB; reactor No. 4: 313 mg/L de pentano y reactor No. 5: 461 mg/L de pentano-EMTB.

Bajo las condiciones descritas anteriormente se encontró un promedio de 885 mg/L, 257.5 mg/L, 150 mg/L, 158 mg/L y 150 mg/L, respectivamente, de sólidos suspendidos volátiles (SSV)¹¹ en los bioensayos cinéticos.

Bioensayos experimentales y bioaugmentación. Fueron tomados 480 mL del reactor 1; 240 mL del reactor No 2; 360 mL del reactor No. 3; 400 mL del reac-

tor No. 4 y 400 mL del reactor No. 5. Fueron repartidos en 12, 6, 8, 10 y 10 tubos Falcon[®], respectivamente. Fueron centrifugados en una centrífuga Beckman a 6,000 y 9,000 rpm, a 25°C por periodos de entre cinco y diez minutos; las biomasas se concentraron y resuspendieron en cuatro diferentes tubos Falcon[®] con 40 mL de MC, a estas cinco suspensiones de biomasas se les denominó biomasas concentradas.

Se realizaron cinco bioensayos cinéticos diferentes, uno para cada una de las biomasas, con el objetivo de evaluar la biodegradación de los BTEX, el EMTB y el etanol por la acción metabólica de los microorganismos presentes en las biomasas aclimatadas a los diferentes sustratos.

Muestras de la biomasa aclimatada al Diesel

Muestras de cinética con biomasa aclimatada a Diesel. Fueron preparadas diez muestras que contenían 20 mL de medio mineral concentrado, 2 mL de biomasa concentrada aclimatada a Diesel y 50 mg/L de cada uno de los BTE-oX y 50 mg/L de EMTB. Fueron monitoreadas por un periodo de tiempo de 54 hrs, con intervalos de muestreo de 6 hrs.

Muestras de cinética con biomasa aclimatada a Diesel y suelo. Fueron preparadas diez muestras que contenían 20 mL de medio mineral concentrado, 2 mL de biomasa concentrada aclimatada a Diesel, 5 g de suelo estéril y 50 mg/L de cada uno de los BTE-oX y 50 mg/L de EMTB. Fueron monitoreadas por un periodo de tiempo de 54 hrs., con intervalos de muestreo de 6 hrs.

Muestras de cinética con biomasa aclimatada a Diesel, suelo y surfactante. Fueron preparadas diez muestras que contenían 20 mL de medio mineral concentrado, 2 mL de biomasa concentrada aclimatada a Diesel, 5 g de suelo estéril, 25 mg/L de tergitol NP10 y 50 mg/L de cada uno de los BTE-oX y 50 mg/L de EMTB. Fueron monitoreadas por un periodo de tiempo de 54 hrs., con intervalos de muestreo de 6 hrs.

Muestras control. Estas muestras sólo contenían 20 mL de medio mineral concentrado y 50 mg/L de cada BTE-oX, 50 mg/L de EMTB y dos gotas de H_3PO_4 , para evitar el crecimiento microbiano. Es-

tas muestras se realizaron con la finalidad de controlar las posibles pérdidas por volatilización durante el desarrollo de la cinética.

Muestras de las diferentes biomasa aclimatadas a gasolina, EMTB, pentano y pentano EMTB

Muestras de cinética con biomasa aclimatada a gasolina. Fueron preparadas seis muestras con 20 mL de MCS y 2 mL de biomasa concentrada aclimatada a gasolina. Los contaminantes fueron monitoreados por 48 hrs., con intervalos de muestreo de 8 hrs.

Muestras de cinética con biomasa aclimatada a EMTB. Fueron preparadas seis muestras con 10 mL de MCS y 2 mL de biomasa concentrada aclimatada a EMTB y seis muestras con DCPC (0.074 mg/L), además de MCS y la biomasa. Los contaminantes fueron monitoreados por 432 hrs., con diferentes intervalos de tiempo de muestreo.

Muestras de cinética con biomasa aclimatada a pentano. Fueron preparadas diez muestras con 10 mL de MCS y 2 mL de biomasa concentrada aclimatada a pentano y diez muestras con DCPC (0.074 mg/L), además de MCS y la biomasa. Los contaminantes fueron monitoreados por 912 hrs., con diferentes intervalos de tiempo de muestreo.

Muestras de cinética con biomasa aclimatada a pentano-EMTB. Fueron preparadas diez muestras con 10 mL de MCS y 2 mL de biomasa concentrada aclimatada a pentano-EMTB y diez muestras con DCPC (0.074 mg/L), además de MCS y la biomasa. Los contaminantes fueron monitoreados por 720 hrs., con diferentes intervalos de tiempo de muestreo.

Muestras control. Para todas las cinéticas se realizaron muestras con MCS y dos gotas de H_3PO_4 , para evitar el crecimiento microbiano.

Escalamiento a reactor de biopelícula de flujo continuo

Montaje del reactor. Se operó un reactor de flujo continuo (RFC) de vidrio de 3.54 pulgadas de diámetro interno y 29.1 pulgadas de altura, con siete puertos de muestreo, el primero y el último destinados a monitorear el influente y el efluente, res-

pectivamente, y los cinco puertos restantes distribuidos a lo largo del reactor. Se contó con una cámara de gases con filtro de carbón activado en la parte superior del reactor para la evaluación de pérdidas por volatilización. El RFC fue empacado con un acondicionador de suelo (material soporte para la fijación de microorganismos) y con 5.9 y 3.5 pulgadas de grava en la parte inferior y superior del reactor, respectivamente. El RFC contó con un suministro de aire (bomba MÁXIMA®) y otro de alimentación del influente; el volumen de trabajo fue de 3.0 L y el flujo de alimentación fue controlado con una bomba peristáltica VWR®

Preparación, fijación y crecimiento de la biomasa en el reactor. Se tomó 1 L de suspensión de biomasa aclimatada a gasolina y fue repartida en doce tubos Falcon®. La biomasa aclimatada fue centrifugada a 6,000 rpm y 25°C por cinco minutos hasta ser concentrada y resuspendida en dos tubos Falcon® con 35 mL de MC cada uno. Posteriormente, la biomasa concentrada fue suspendida en 4L de MCS, los cuales fueron circulados a través del reactor por dos semanas, con una alimentación diaria de 50 mg/L de cada sustrato.

Incubación y análisis. Todas las muestras fueron incubadas en una incubadora Shaker, con una agitación de 200 rpm a 30°C, hasta el tiempo de su análisis. Los BTEX, EMTB y etanol fueron analizados por cromatografía de gases con detector de ionización de flama. Las determinaciones de CG/DIF se realizaron con un cromatógrafo Varian Star 3400, de acuerdo a procedimientos estandarizados¹² con algunas modificaciones. La muestra fue inyectada por el método de purga y trampa. El inyector se mantuvo en el modo split/splitless (1:20) y su temperatura fue de 250°C. La temperatura del detector fue de 300°C. El volumen de muestra purgado fue de 5 mL; antes de ser purgada la muestra se llevó a cabo un proceso de prepurga por 1.5 minutos y se calentó hasta 90°C por un espacio de 2.6 minutos, después se purgó por diez minutos y se concentró antes de ser inyectado al cromatógrafo.

Resultados

En los bioensayos de la biomasa aclimatada a diesel en los diferentes tipos de muestras se observó que

las muestras que contenían biomasa suelo y tergitol NP10 fueron las que reportaron en general los

Tabla I. Porcentajes finales de biodegradación de BTE-oX y EMTB de la biomasa aclimatada Diesel en reactores de lote.

	Biomasa	Biomasa y Suelo	Biomasa, suelo y Tergitol-NP10
Benceno	74.2	64.8	78.2
Tolueno	98.6	95.7	95.6
Etilbenceno	97.2	95.6	97.6
o-Xileno	19.4	20.4	40.8
EMTB	8.6	7.2	10.3

mejores resultados de biodegradación de los compuestos contaminantes (tabla I), Acuña-Askar *et al.*¹⁰ reportan comportamientos muy parecidos bajo estas condiciones, esto pudo deberse a la presencia del mismo surfactante, el cual pudo haber provocado un aumento en la biodisponibilidad de los contaminantes, favoreciendo así la biodegradación de los mismos

En la cinética tratada con biomasa aclimatada a gasolina, los BTEX fueron biodegradados casi completamente para las 24 hrs., de llevarse a cabo la cinética, mientras que el etanol, al final del monitoreo, fue biodegradado en 85.48% y el EMTB

Tabla II. Porcentajes finales de biodegradación de BTEX, EMTB y etanol de la biomasa aclimatada a gasolina en reactores de lote.

	Gasolina
Benceno	99.98
Tolueno	99.98
Etilbenceno	99.56
o-Xileno	99.40
m y p-Xileno	99.60
EMTB	28.07
Etanol	85.48

mostró su alta recalcitrancia al haberse degradado solamente 28.07%; sin embargo, este porcentaje de biodegradación para EMTB supera los obtenidos en trabajos anteriores, en los que se utilizó biomasa aclimatada a gasolina para la biodegradación de BTEX y EMTB.¹

Para las biomásas de EMTB, pentano y pentano-EMTB en ausencia de DCPC, los porcentajes de

Tabla III. Porcentajes finales de biodegradación de BTEX, EMTB y etanol sin DCPC para las diferentes biomásas en reactores de lote.

	EMTB	Pentano	Pentano-EMTB
Benceno	99.97	99.98	99.98
Tolueno	99.93	99.98	99.98
Etilbenceno	99.87	99.98	99.98
o-Xileno	99.50	99.85	99.90
m y p-Xileno	99.85	99.95	99.97
EMTB	57.00	24.76	71.28
Etanol	74.86	84.21	99.98

biodegradación de los contaminantes se vieron más favorecidos que en los resultados antes mostrados, sin embargo, la biomasa aclimatada a pentano-EMTB favoreció en mayor medida la degradación del EMTB (tabla III).

La presencia de DCPC en las muestras de las biomásas de EMTB, pentano y pentano-EMTB,

Tabla IV. Porcentajes finales de biodegradación de BTEX, EMTB y etanol con DCPC para las diferentes biomásas en reactores de lote.

	EMTB	Pentano	Pentano-EMTB
Benceno	99.83	99.98	99.98
Tolueno	99.93	99.98	99.98
Etilbenceno	99.83	99.98	99.98
o-Xileno	99.80	99.91	99.93
m y p-Xileno	99.98	99.97	99.97
EMTB	80.00	19.36	97.26
Etanol	99.83	99.98	99.98

Tabla V. Porcentajes de biodegradación de BTEX, EMTB y etanol con y sin DCPC, con una mezcla de biomasa acclimatadas a EMTB y a pentano-EMTB en un reactor de flujo continuo, con grava como soporte de crecimiento.

	Benceno	Tolueno	Etilbenceno	o-Xileno	m-,p-Xileno	EMTB	Etanol
Tiempo de retención hidráulico de 12 hrs., en ausencia de DCPC							
% Deg.	99.87	99.97	99.96	99.92	99.96	67.76	99.85
Tiempo de Retención Hidráulico de 6 hrs., en ausencia de DCPC							
% Deg.	99.82	99.85	99.89	99.78	99.96	64.02	99.81
Tiempo de Retención Hidráulico de 3 hrs., en ausencia de DCPC							
% Deg.	99.97	99.97	99.98	99.94	99.96	27.11	99.98
Tiempo de Retención Hidráulico de 1.5 hrs., en ausencia de DCPC							
% Deg.	81.52	94.58	99.62	76.01	98.16	16.30	98.74
Tiempo de Retención Hidráulico de 1.5 hrs., en presencia de DCPC							
% Deg.	54.84	66.27	92.67	50.55	68.38	19.34	89.07
Tiempo de Retención Hidráulico de 24 hrs., en presencia de DCPC							
% Deg.	99.67	99.89	99.98	99.86	99.97	24.63	99.49

provocó, en el caso de la biomasa acclimatada a EMTB y la biomasa acclimatada a pentano-EMTB, un aumento marcado en la degradación del EMTB, favoreciendo así la eliminación de este compuesto altamente recalcitrante (tabla IV).

Con el reactor de biopelícula de flujo continuo, utilizando grava como soporte de crecimiento, se logró biodegradar la mezcla de BTEX, EMTB y etanol hasta 67.76% para EMTB y casi 100% para cada uno de los BTEX y etanol a un tiempo de retención hidráulico de doce horas. Los porcentajes de biodegradación de BTEX, EMTB y etanol en las cinéticas llevadas a cabo en ausencia de DCPC incrementaron al aumentar el tiempo de retención hidráulico.

Conclusiones

De todas las biomasa acclimatadas a diferentes sustratos probadas en los reactores de lote, resultaron ser más efectivas, para la biodegradación de los BTEX, el EMTB y el etanol, las acclimatadas a EMTB y pentano-EMTB, cuyas efectividades se incrementaron aún más al estar presente en el medio la DCPC, mientras que en el reactor de biopelícula de flujo continuo de todos los tiempos de retención hidráulicos probados, se estableció como el mejor para poder, en un futuro, escalar a nivel industrial el de seis horas, debido a los porcentajes

de biodegradación tan cercanos a los obtenidos con el de doce horas, y la ventaja en la disminución de 50% en el tiempo del proceso que representa.

En el sistema de biopelícula, contrario a lo que se esperaba por los resultados obtenidos en lote los porcentajes de biodegradación, disminuyeron con la presencia de la DCPC, se atribuye este efecto desfavorable de la DCPC al corto tiempo en que las células estuvieron en contacto con el inductor enzimático, las características de las células que conforman la biopelícula y a la posible participación de la DCPC como un inhibidor en la biodegradación de los contaminantes de interés.

Resumen

El benceno, tolueno, etilbenceno y la mezcla de xilenos (BTEX), junto con éter metil *tert*-butílico (EMTB) son compuestos orgánicos volátiles, estos junto con el etanol comúnmente son encontrados en sitios contaminados con gasolinas. En este estudio se evaluó la biodegradación de estos contaminantes mediante consorcios microbianos acclimatados a diferentes sustratos (diesel, gasolina, EMTB, pentano y pentano-EMTB) en sistemas aerobios de lote y de biopelícula de flujo continuo. A partir de éste último sistema se lograron los máximos porcentajes de biodegradación que fueron casi de 100% para cada uno de los BTEX y etanol; y de 67.76%

para el EMTB, a un tiempo de retención hidráulico de doce horas.

Palabras clave: Oxigenante, Aclimatación, Biodegradación, Reactor de biopelícula de flujo continuo.

Abstract

Benzene, toluene, ethylbenzene, mixed xylenes (BTEX), and methyl *tert*-butyl ether (MTBE) are volatile organic compounds (VOCs). These compounds, along with ethanol, are commonly found in gasoline-contaminated sites. In this study the biodegradation of these polluting agents was evaluated using bacterial populations previously acclimated to different substrates (diesel, gasoline, MTBE, pentane, and pentane-MTBE) in batch reactors and a continuous-flow biofilm reactor under aerobic conditions. The maximum percentage of biodegradation was obtained with the continuous-flow biofilm reactor; it was almost of 100% for each of the BTEX and ethanol, and 67.76% for MTBE, in a hydraulic retention time of 12 hours.

Keywords: Oxygenate, acclimatization, biodegradation, continuous-flow biofilm reactor.

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt), mediante los proyectos I32968-B, 990345 y 47370. Asimismo, se agradece al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (Paicyt) de la UANL, por el apoyo recibido mediante los proyectos SA672-02, SA591-01, SA241-99 y CA1075-05. Se agradece también al Instituto Mexicano del Petróleo, a través del proyecto interinstitucional FIES-F48-VI. Se agradece al Dr. Hugo A. Barrera Saldaña, al Dr. Juan Manuel Alfaro Barbosa y al M.C. Alejandro García García, por las facilidades brindadas para la realización del presente proyecto.

Referencias

1. Acuña-Askar K., Englande A.J., Hu C., Jin G. (2000). Methyl tertiary-butyl ether (MTBE) biodegradation in batch and continuous upflow fixed-biofilm reactors. *Wat. Sci. Tech.*, 42: 153-161.
2. Dean B.J. (1985). Recent findings on the genetic toxicology of benzene, toluene, xilenes and phenols, *Mutant. Res.*, 145: 153-181.
3. Belpoggi P., Soffritti M., Maltoni C. (1995). Methyl-Tertiary-Butyl Ether (MTBE) -A Gasoline Additive- Causes Testicular and Lymphohaematopoietic Cancers in Rats, *Toxicol. Ind. Health*.
4. Deeb R.A., Chu K.H., Shih T., Linder S. (2003). MTBE and Other Oxigenates: Enviromental Sources, Analysis, Ocurrence, and Treatment, *Environmental Engineering Science*, 20:5 433-447.
5. USEPA. (2001). National Primary Drinking Water Standards. Office of Water, United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA, Marzo.
6. USEPA. (2004). National Primary Drinking Water Standards. Office of Water, United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA.
7. DOF. (2000). Diario Oficial de la Federación. Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Salud. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994. Salud Ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización, 22 noviembre.
8. Stiner, L., Halverson L. J. (2002). Development and characterization of a green fluorescent protein based bacterial biosensor for bioavailable toluene and related compounds. *Appl. Environ. Micro*, 68:1962-1971.
9. Fayolle F., Vandecasteele J.P., Mont F. (2001). Microbial degradation and fate in the enviroment of methyl *tert*-butyl ether and related fuel oxygenates, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56: 339-349.
10. Acuña-Askar K., Englande A.J. Jr., Ramírez-Medrano A., Coronado Guardiola J.E., Chávez-Gómez B. (2003). Evaluation of biomass production in unleaded gasoline and BTEX-fed batch reactors. *Wat. Sci. Tech.*, 48:8, 127-

- 133.
11. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th edn, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington, DC, USA., 1998.
 12. USEPA. (1995). Method 624-purgeables. U. S. Environmental Protection Agency. Code of Federal Regulation 40 CFR 806. Washington DC, USA.
 13. Garnier P., Auria R., Auger C., Revah S. (1999). Cometabolic biodegradation of metil t-butyl ether by *Pseudomonas aeruginosa* grown on pentane, *Appl. Microbial. Biotechnol.*, 51: 498-503.
 14. Piveteau P., Fayolle F., Penru L.Y., Monot F. (2000). Biodegradation of MTBE by cometabolism in Laboratory-scale fermentations, The Secons International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds, Monterey, California, mayo 22-25.
 15. Villarreal-Chiu J.F. (2003). Obtención de las constantes cinéticas de biodegradación de BTEoX en presencia de EMTB por un consorcio microbiano mixto aclimatado a BTEX; en matrices acuosas y de suelo, en presencia y ausencia del surfactante Tergitol NP-10. Tesis profesional, Facultad de Ciencias Químicas, UANL, Monterrey, N.L.2003.

Recibido: 7 de septiembre de 2006

Aceptado: 15 de septiembre de 2006