

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

**TÍTULO DEL TRABAJO:
CARACTERIZACIÓN DE CEPAS MICROBIANAS
AEROBIAS DEGRADADORAS DE BTX's Y MTBE**

**INFORME TÉCNICO DE LA OPCIÓN CURRICULAR EN LA MODALIDAD DE:
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**P ARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO BIOTECNÓLOGO**

**PRESENTA:
CRISTIAN MATA RODRÍGUEZ**

ASESORES:

Dra VERÓNICA NAVA RAMÍREZ (Externo)
M. en C. GLORIA LÓPEZ JIMÉNEZ (interno)

EVALUADORES:

M. en C. MARÍA GUADALUPE ORDORICA MORALES
M. en C. MARÍA ELENA ROSALES PEÑA ALFARO



México, D. F. 20 del mes Mayo del año 2008



SECRETARÍA
DE
EDUCACIÓN PÚBLICA

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGIA



México., D. F., a 10 de Septiembre de 2007.
Of. No. SA-UPIBI-1541/07

MATA RODRÍGUEZ CRISTIAN
7º SEMESTRE DE LA CARRERA DE
INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
Presente.

Comunico a usted, que como resultado de la evaluación del Comité de Proyecto Terminal, con esta fecha queda registrado su proyecto terminal en la modalidad de "PROYECTO DE INVESTIGACION" denominado "**Caracterización de cepas microbianas aerobias degradadoras de BTX's y MTBE**" bajo la asesoría externa de la Dra. Verónica Nava Ramírez, e interna de la M. en C. Gloria López Jiménez.

De cumplir con las condiciones que abajo se indican, será acreditada la opción curricular de titulación. Asimismo me permito recordarle que el trabajo experimental deberá concluir en el octavo semestre y entregar el informe técnico final, de conformidad con los lineamientos que para tal fin establezca el Comité mencionado.

CONDICIONES

1. Permanecer en la misma opción y actividad en el Proyecto Terminal I, II y III.
2. Obtener una calificación igual o superior a 8.0 en Proyecto Terminal I, II y III.
3. Cumplir con el 90% de asistencia a las actividades asignadas.
4. Cumplir con los demás requisitos que se fijan en el programa de estudios de la asignatura.

ATENTAMENTE.
"LA TÉCNICA AL SERVICIO DE LA PATRIA"

ING. YESICA MARÍA DOMÍNGUEZ GALICIA.
SUBDIRECTORA ACADÉMICA.



INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL
INTERDISCIPLINARIA DE
BIOTECNOLOGIA
SUBDIRECCION ACADÉMICA

c.c.p. M. en C. LEOBARDO ORDAZ CONTRERAS. Jefe de la Unidad de Tecnología Educativa y Campus Virtual de la UPIBI/IPN.
Expediente de Proyecto Terminal.

Dedico este trabajo,

**A mi mamá Luciana Rodríguez Palacios
A mi papá Gustavo Mata Durán
y a mis hermanos Karla y César**

**Por su apoyo y comprensión incondicional en
todo momento.**

Agradezco,

**A la Dra. Verónica Nava Ramírez
A la Dra. Gloria López Jiménez
A mis evaluadores
y al Instituto Mexicano del Petróleo**

Índice

Tema	No de pagina
Resumen	6
Índice de tablas	7
Índice de figuras	7
Abreviaturas	9
1. Introducción	10
2. Antecedentes	11
2.1 Tipos de gasolinas en México	11
2.1.1 Producción de gasolina en México	12
3. BTEX	12
3.1 Efectos de los BTEX en la Salud	15
3.2 Normatividad sobre BTEX	15
3.3 Biodegradación de BTEX	16
4. MTBE	20
4.1 Uso y empleo de MTBE en gasolinas de México	21
4.2 Efectos en la salud del MTBE	21
4.3 Contaminación de agua por MTBE	22
4.4 Biodegradación de MTBE	23
5. Justificación del Proyecto	28
6. Objetivos	29
6.1 Objetivo general	29
6.2 Objetivos Particulares.....	29
7. Estrategia experimental	30
7.1 Esquema de la metodología	30
7.2. Metodología.....	31
7.2.1 Origen de los cultivos	31
7.2.2 Propagación y asilamiento de los consorcios M1-IMP a M13-IMP	31
7.2.3 Conservación de cepas	33
7.2.4 Preparación del inóculo	33
7.2.5 Pruebas bioquímicas	24
7.2.5.1. Interpretación pruebas bioquímicas	35
7.2.6. Cinéticas de biodegradación de BTX, MTBE y TBA	36
7.2.6.1 Cinéticas de biodegradación	36
7.2.6.2 Muestreo	37
8.2.7 Análisis Fisicoquímicos	37
8.2.7.1 Cuantificación de proteína	37
8.2.7.2 Cuantificación de MTBE y TBA en fase líquida	38
8.2.7.3 Cuantificación de BTX en fase gas	39
8.2.7.4 Cuantificación de Dióxido de carbono	39

8. Resultados	41
8.1 <i>Obtención de cultivos</i>	41
8.2 <i>Caracterización morfológica y bioquímica de los cultivos</i> .	43
8.3 <i>Cinéticas de Degradación de compuestos BTX's, MTBE y TBA</i>	48
8.3.1 <i>Cinéticas de degradación de compuestos BTX's</i>	48
8.3.2 <i>Cinéticas de degradación de compuestos MTBE y TBA</i>	54
9. Conclusiones	58
10. Recomendaciones	59
11. Anexos	60
12. Bibliografía	68

Índice de tablas y figuras

Tablas	No de pagina
• Tabla1. Solubilidad de compuestos BTEX en agua.....	13
• Tabla 2 Niveles máximos permisibles de BTEX en el agua para EUA (norma de BTEX EPA 2000) y niveles permisibles de BTEX en agua para México NOM-EM-138-SEMARNAT-2003...	15
• Tabla 3. Límites máximos permisibles de contaminación en suelos (valores referidos a base seca) mg/kg (ppm)	18
• Tabla 4. Microorganismos que pueden degradar compuestos BTEX (guía técnica de atenuación natural 2005 anexo A).....	15
• Tabla 5. Tasas de degradación y % de remoción para BTEX obtenidas en diferentes estudios.....	19
• Tabla 6- Monitoreo de MTBE en la ciudad de México 2001 (Buenrostro y Dovalí, 2001).....	22
• Tabla 7. Velocidades de degradación observadas con diferentes cultivos, puros y mixtos en condiciones aerobias (adaptado de Fiorenza y Rifal, 2003).....	25
• Tabla 8. Microorganismo capaces de degradar MTBE en cometabolismo. (Adaptado de Stephanie Fiorenza & Rifai., 2003).....	26
• Tabla 9. Composición de agar nutritivo	32
• Tabla 10. Composición de medio mineral utilizado para la propagación de las cepas	32
• Tabla 11. Composición de la solución de oligoelementos traza (Fortín y Deshusses 1999)	33
• Tabla 12. Pruebas bioquímicas API 20 NE	34
• Tabla 13. Pruebas bioquímicas API 20 NE	35
• Tabla 14- Cultivos específicos obtenidos a partir de los 13 cultivos originales.	41
• Tabla 15. Caracterización morfológica de las 18 cepas obtenidas en el proceso de aislamiento	44
• Tabla 16. Caracterización bioquímica de las 18 cepas obtenidas en el proceso de aislamiento.....	45
• Tabla 17. Porcentaje de sustrato mineralizado (despreciando respiración endógena) para BTX's.....	51
• Tabla 19. Parámetros cinéticos obtenidos de la degradación de compuestos BTX	56
• Tabla 20. Porcentaje de sustrato mineralizado (despreciando respiración endógena) para MTBE y TBA.....	54
• Tabla 21. Tasas de degradación de MTBE y TBA y % de remoción de dichos compuestos	56

Figuras

• Figura 1. Producción de gasolina en el 2006 en miles de barriles/día	12
• Figura 2. Fórmulas subdesarrolladas de los compuestos BTEX .	13
• Figura 3. Proporción de los BTEX en la gasolina (Jesper Steen Christensen & Jason Elton, 1998)	14
• Figura 4. Ruta general de biodegradación de un compuesto aromático como los (BTEX) (Román 2005 anexo A)	17
• Figura 5. Fórmula del MTBE	26
• Figura 6. Ruta metabólica propuesta para la degradación de MTBE por una bacteria oxidante de propano (Steffan et al., 1997).	24
• Figura 7. Esquema de la de metodología	30
• Figura 8. Cultivos de muestras originales (A), cultivos con crecimiento en Tolueno (B), cultivos con crecimiento en Xileno (C) y cultivos con crecimiento en MTBE (D)	42
• Figuras 9. Cultivo puro original (A) bacilo (-), cultivo puro de tolueno (B) coco (-), cultivo puro de tolueno (c) coco (+)	43
• Figura 10. Degradación de o-Xileno con las cepas: M 3,1,2 o-X, M 3,1,1 o-X y M 9,1 o-X	48
• Figura 11. Degradación de Tolueno con las cepas: M 3,1 T, M 3,2 T y M 6 T	44
• Figura 12. Degradación de Benceno con las cepas: M 3,1,1 B y M 3,2 B	49
• Figura 13. Producción de CO ₂ durante las cinéticas de degradación de los compuestos BTX.....	50
• Figura 14. Degradación de MTBE con las cepas M 1,1' MTBE, M 2,1 MTBE y M 2 MTBE	54
• Figura 15. Degradación de TBA con las cepas M 7,1 TBA, M 11, 1 TBA y M 3,1 TBA	54
• Figura 16. Producción de CO ₂ durante las cinéticas de degradación de los compuestos MTBE y TBA.	55

Abreviaturas

BTEX	Benceno, Tolueno, Etilbenceno y o,m,p-Xilenos
BTX	Benceno, Tolueno y o-Xileno
MTBE	Metil ter-Butil Éter
TBA	Alcohol terbutílico
PEMEX	Petróleos Mexicanos
EPA	Agencia de Protección Ambiental de EUA
PROFEPA	Procuraduría Federal del Medio Ambiente

1. Introducción

Dentro de los contaminantes de mayor importancia en el ámbito mundial, se encuentran los compuestos que se obtienen a través del fraccionamiento del petróleo, tales como: gasolinas, diesel y combustóleo. La alta producción y uso de estos energéticos, genera serios problemas de contaminación ambiental ya sea terrestre o atmosférica.

Entre los problemas de contaminación terrestre se encuentra la contaminación de mantos acuíferos, que puede darse por una gran variedad de contaminantes, entre los cuales se encuentran algunos hidrocarburos presentes en la gasolina.

A continuación se presentan algunos datos publicados por PROFEPA, de las principales fuentes y orígenes de contaminación por hidrocarburos que perjudican nuestro entorno y recursos naturales. (PROFEPA, 2001)

- El 57% de las emergencias ambientales que se presentan a nivel nacional con materiales peligrosos ocurren en instalaciones de PEMEX
- El 88.7 % de las emergencias ambientales de PEMEX ocurren en Veracruz, Campeche y Tabasco.
- El 90% de las emergencias ambientales de esta paraestatal ocurren en PEMEX Exploración y Producción (PEP) y PEMEX Refinación (PR).
- En PEP la mayor parte de sus eventos ocurre, en ductos, pozos petroleros, baterías de separación y estaciones de compresión
- En Pemex-Refinación la mayor parte de sus eventos ocurre, en ductos, refinerías, terminales de almacenamiento y distribución y terminales marítimas

La afectación de las emergencias ambientales de PEMEX es en promedio (PROFEPA, 2001):

- 70% al suelo
- 30% al agua
- 10% al aire

Para eliminar la contaminación por hidrocarburos en agua, existen diversas técnicas, como las fisicoquímicas en las que destacan la adsorción y absorción que se basan en la utilización de matrices para retener o atrapar al contaminante. La ventaja de estas técnicas es que no se agregan componentes

extras para llevar a cabo el proceso (tales como: surfactantes, agentes coagulantes y precipitantes). Sólo se hace pasar el contaminante por las matrices, y este queda atrapado o adherido. Sin embargo, son altamente costosos, y pueden requerir de grandes áreas de contacto entre el contaminante y la matriz para remover la mayor cantidad de contaminante (Lesser 2002)

Las técnicas biológicas, en contraste, utilizan la actividad metabólica de algunos microorganismos para degradar a los contaminantes. Las ventajas de estas técnicas son que los contaminantes pueden ser degradados a compuestos menos agresivos con el medio ambiente, se pueden alcanzar eficiencias de remoción cercanas al 100%, implican bajos costos, Sin embargo, no todos los microorganismos tienen la capacidad de degradar compuestos contaminantes por lo que hay que buscar cepas puras o cultivos mixtos capaces de oxidar los compuestos de interés, y adicionalmente en la mayoría de los casos los microorganismos requieren largos periodos de adaptación (Román 2005).

2. Antecedentes

2.1 Tipos de gasolinas en México

Las gasolinas actuales se componen de una mezcla de hidrocarburos que contienen moléculas con cadenas de 5 a 9 átomos de carbono, obtenidas de una mezcla de destilación directa, de craqueo térmico y catalítico, de alquilación, de isomerización y de refinados de la separación extractiva del benceno y tolueno. (Secretaría de energía 2006)

En México se producen actualmente dos tipos de gasolina: PEMEX Magna y PEMEX Premium, estas gasolinas no contienen plomo, su contenido de azufre es bajo y tienen un alto octanaje en comparación con PEMEX Nova, que dejó de producirse por su alto contenido de plomo. El tetraetilo de plomo contribuía a elevar el número de octano, sin embargo durante el proceso de combustión se producían óxidos de plomo, que eran liberados a la atmósfera y quedaban suspendidos hasta en un 15% en el aire, estos óxidos de plomo generaban problemas graves en la salud de los humanos como: hipertensión, daño en el sistema nervioso, daño en el sistema hepático, entre otros (Lenntech Agua residual & purificación del aire 2008).

Debido a los problemas generados en la salud del ser humano el plomo fue sustituido en las gasolinas Magna y Premium por el Metil ter-butil-éter (MTBE)

que incrementa la cantidad de oxígeno en la mezcla contribuyendo a su mejor combustión dentro del motor, disminuyendo la emisión de compuestos orgánicos volátiles a la atmósfera. Sin embargo el MTBE se ha asociado a problemas de contaminación del agua de los mantos freáticos en la última década. (Garfias y Gutiérrez, 2003)

2.1.1 Producción de gasolina en México

La sociedad mexicana con el transcurso del tiempo ha creado una dependencia del transporte particular automovilístico, para desplazarse a sus distintos puntos de trabajo o convivencia, este aumento de uso del automóvil particular, aumenta la demanda de gasolina en México provocando mayores problemas de contaminación al medio ambiente (Garfias y Gutiérrez, 2003). La producción de gasolina en México durante 2006 se muestra en la figura 1. (Secretaría de energía 2007)

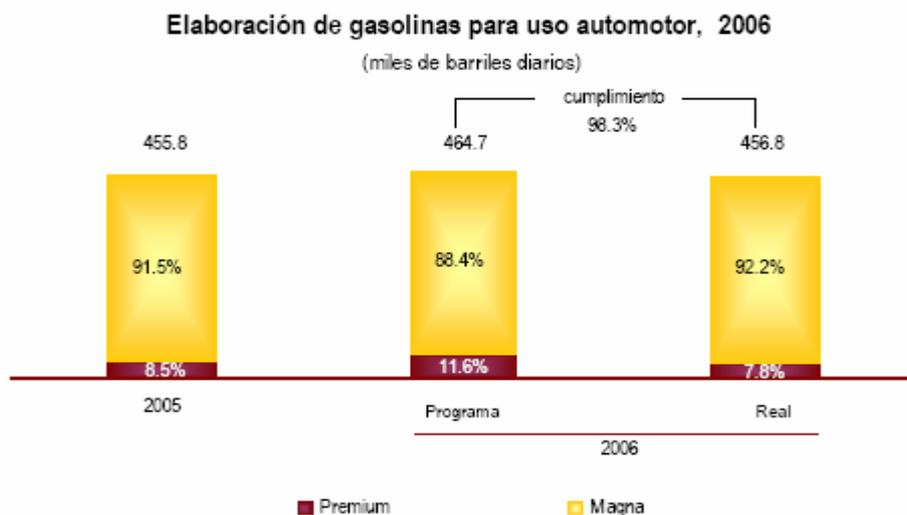


Figura 1. Producción de gasolina en el 2006 en miles de barriles diarios (Petróleos Mexicanos mayo 2007)

3. BTEX

El grupo de BTEX consiste en el benceno, el etil-benceno, tolueno, y tres isómeros de xileno, sus formulas se muestran en la figura 2. Debido a su polaridad y las características de solubilidad, los productos químicos orgánicos (BTEX) pueden incorporarse a los sistemas del suelo y del agua subterránea y causar problemas serios de contaminación cuando estos compuestos son liberados junto con la gasolina a través de derrames o fugas (Jesper Steen Christensen & Jason Elton, 1998). La solubilidad en agua de estos compuestos

determinará el grado de migración del contaminante BTEX en el suelo y agua de acuerdo a la tabla 1

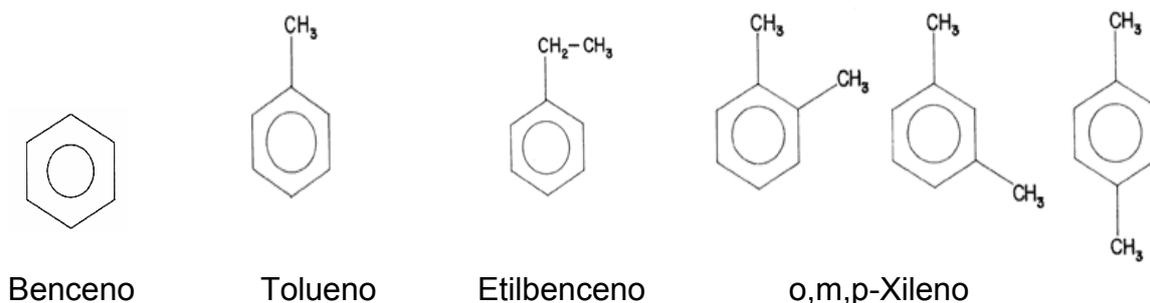


Figura 2 - Formulas subdesarrolladas de los compuestos BTEX

Tabla1. Solubilidad de compuestos BTEX y MTBE en agua (PROFEPA, 2001)

Compuesto	Solubilidad en agua: mg/L (ppm)
MTBE	50000
Benceno	700
Tolueno	500
Etilbenceno	100
Xileno	0.1

El gradiente de contaminación de compuestos BTEX esta determinado de acuerdo a la solubilidad que estos tienen, si se genera en un área de suelo contaminado con BTEX, los compuestos mas solubles migrarán con mayor facilidad hacia la parte acuosa del sistema contaminado como los mantos acuíferos, mientras los que tiene una solubilidad menor tendrán una mayor dificultad para incorporarse a los sistemas acuosos quedando atrapados en las capas de tierra del sistema contaminado.

Una fuente de contaminación de BTEX son los derrames o fugas de combustibles (gasolina, por ejemplo) que contienen estos compuestos. En la figura 3 se muestra el contenido de BTEX en las gasolinas nacionales y la proporción de cada compuesto (Jesper Steen Christensen and Jason Elton, 1998).

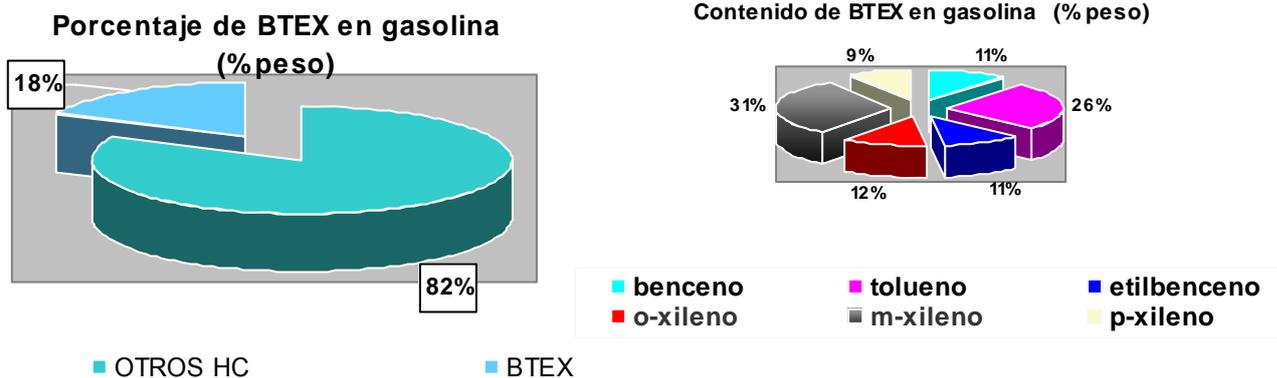


Figura 3. Proporción de los BTEX en la gasolina (Jesper Steen Christensen & Jason Elton, 1998)

Existen diversos factores que afectan la contaminación de suelos y agua subterránea por BTEX: volatilización, absorción, adsorción y degradación microbiana.

Al analizar un sitio contaminado con gasolina hay que considerar que un volumen determinado de gasolina se ha volatilizado debido a la alta volatilidad que presentan dichos compuestos y al peso molecular relativamente bajo de algunos componentes.

La absorción y adsorción determinan el movimiento de los contaminantes en el suelo y el agua subterránea. La adsorción esta dada por las interacciones polares entre los contaminantes y la matriz del suelo. Por otro lado, la absorción es influenciada por las características de la matriz del suelo, como la porosidad, y solubilidad del contaminante.

El lavado por lluvia, es otro de los factores que influye en la contaminación, si este fenómeno ocurre durante alguna contaminación por gasolina, el suelo se “lavara” y probablemente quedará libre de contaminantes, pero la lluvia ayudará a que los contaminantes se integran con mayor facilidad a los mantos acuíferos.

Por lo antes mencionado la concentración de contaminantes derramados en un punto determinado no será la misma conforme transcurre el tiempo.

3.1 Efectos de los BTEX en la Salud.

La exposición a BTEX puede ocurrir por: ingestión de agua contaminada con BTEX, inhalación si se esta cerca de sitios contaminados con gasolina o absorción a través de la piel al entrar en contacto con agua contaminada. (EPA 2000).

Las exposiciones agudas a los altos niveles de la gasolina y sus componentes BTEX se han asociado a problemas en la piel e irritación sensorial, depresión del sistema nervioso central, y los efectos sobre el sistema respiratorio (EPA marzo 24 2000).

La mayor probabilidad de contaminación por estos compuestos es ocupacional. Según la EPA hay suficiente evidencia en los estudios realizados en humanos y animales para clasificar al benceno como un agente carcinógeno potencial para el humano. Con respecto al Tolueno, Etilbenceno y Xileno, no se tiene suficientes estudios para concluir que son agentes carcinogénicos para el humano pero se piensa que tienen los mismos efectos que el benceno. (EPA marzo 24 2000).

3.2 Normatividad de BTEX.

En los Estados Unidos, la EPA ha establecido límites permisibles para los BTEX en agua potable provista por los sistemas públicos (EPA 2000). En México los límites permisibles de BTEX en agua destinada al consumo humano los establece la SEMARNAT, a través de la NOM- EM-138-SEMARNAT-2003 (SEMARNAT 2003, Tabla 2).

Tabla 2 niveles máximos permisibles de BTEX en agua para EUA (norma de BTEX EPA 2000) y niveles permisibles de BTEX en agua para México NOM-EM-138-SEMARNAT-2003

	EUA (ppm)	México (ppm)
Benceno	0.005	0.01
Tolueno	1	0.3
Etilbenceno	0.7	0.7
xilenos (total)	10	0.5

LA NOM-EM-138-SEMARNAT-2003 establece también Los límites máximos permisibles de contaminación en suelos por hidrocarburos en México, medidos en mg/kg (ppm) (Tabla 3).

Tabla 3. Límites máximos permisibles de contaminación en suelos (valores referidos a base seca) mg/kg

Contaminantes	Uso de suelo predominante			Método analítico (EPA)
	Agrícola, forestal, recreativo y de conservación	Residencial comercial	Industria	
<u>Gasolina</u>				
Benceno	20.00	20.00	50.00	8240*, 8260*
Tolueno	40.00	40.00	100.00	8240*, 8260*
Xilenos	40.00	40.00	100.00	8240*, 8260*

* Métodos analíticos alternativos

3.3 Biodegradación de BTEX

Los compuestos aromáticos son más estables que otros compuestos cíclicos debido a la compartición de electrones deslocalizados por los enlaces π . Bajo condiciones aerobias, todos los BTEX son rápidamente biodegradados como sustratos primarios (dadores primarios de electrones) [Bendient, P.B, 1999,].

Algunos microorganismos son capaces de utilizarlos como fuente de energía y el aceptor final de electrones utilizado será el oxígeno. (Román 2005)

La biodegradación ocurre de manera natural mientras exista suficiente oxígeno y nutrientes en las aguas subterráneas. La tasa de biodegradación natural estará limitada por la falta de oxígeno u otros aceptores de electrones más que por la carencia de nutrientes tales como nitrógeno o fósforo. Sin embargo la demanda de oxígeno procedente de la oxidación aeróbica de estos compuestos puede exceder la solubilidad del oxígeno en agua. Las concentraciones de oxígeno disuelto son rápidamente agotadas debido a la biodegradación de estos contaminantes, llevando al acuífero a condiciones anaerobias (Román 2005)

La biodegradación de una molécula aromática involucra dos etapas: activación del anillo y ruptura del anillo. La activación del anillo involucra la incorporación de oxígeno molecular dentro del anillo, esto es, deshidroxilación del núcleo aromático. Esta etapa es llevada a cabo por enzimas conocidas como oxigenasas (Román 2005)

Las monooxigenasas, catalizan la incorporación de un solo átomo de oxígeno para producir el dihidrodiol (Román 2005)

Las dioxigenasas, catalizan la incorporación de dos átomos de oxígeno molecular a un mismo tiempo para formar un dihidrodiol. Los dihidrodioles son posteriormente oxidados a derivados dihidroxilados tales como catecol, los cuales son precursores para romper el anillo. El catecol puede ser oxidado por la vía orto, la cual involucra ruptura de los enlaces entre átomos de carbono entre los dos grupos hidroxilos dando como producto ácido mucónico o vía meta, la cual involucra la ruptura del enlace entre átomos de carbono con un grupo hidroxilo y el átomos de carbono vecino para producir ácido 6-formil-2-hidroxi-2,4-hexadienoico (2-hidroximucónico semialdehido). Estos compuestos se degradan para formar ácidos los cuales son rápidamente utilizados por microorganismos para síntesis celular y energía (Román 2005)

El proceso descrito anteriormente de biodegradación de una molécula aromática puede verse en la figura 4 (Román 2005 anexo A)

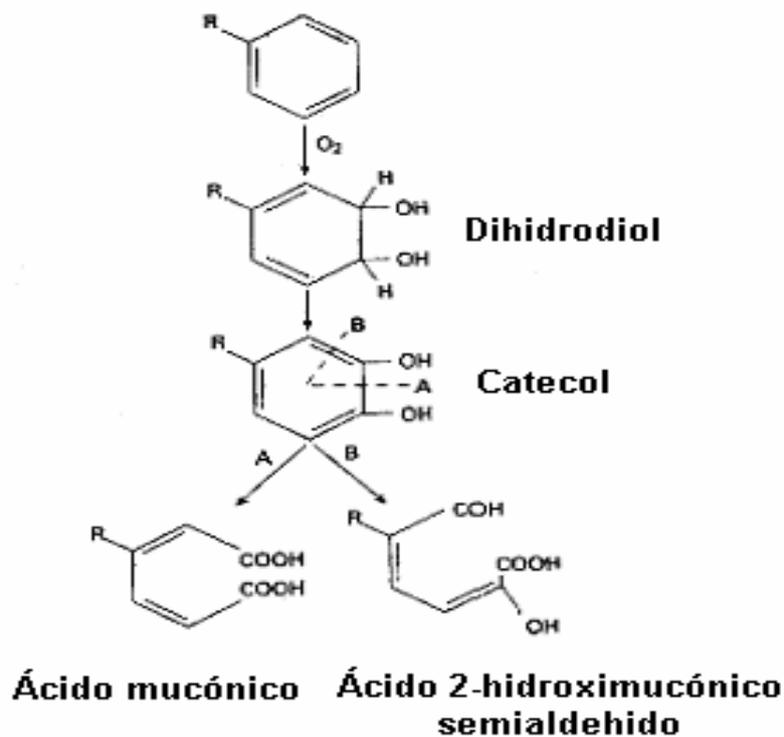


Figura 4. Ruta general de biodegradación de un compuesto aromático como los (BTEX) (Román 2005 anexo A)

Existe una variedad de microorganismos que pueden llevar a cabo la biodegradación de compuestos BTEX, la mayoría de estos microorganismos actúan en consorcios microbianos, ya que de manera individual son inhibidos por los mismos sustratos BTEX, o simplemente mueren debido a la alta toxicidad que tienen dichos compuestos (Román 200). En la tabla 4 se enlistan algunos microorganismos que realizan la biodegradación de compuestos BTEX.

Se han realizado estudios de biodegradación de compuestos BTEX utilizando consorcios microbianos, los cuáles fueron obtenidos de diversos lugares como son: suelos contaminados con gasolina, aguas negras, lodos activados, etc. A estos consorcios microbianos, se les sometió a periodos de adaptación largos (de 6 a 8 meses), para minimizar el bajo crecimiento celular, inhibición por la mezcla de compuestos BTEX y tasas de remoción bajas.

Tabla 4. Microorganismos que pueden degradar compuestos BTEX (Román 2005 anexo A)

Contaminante	Microorganismo
Benceno	<i>Pseudomonas putida</i> , <i>P. rhodochrous</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Methylosinus trichosporium OB3b</i> , <i>Nocardia sp.</i> , <i>methanogenos</i> , <i>anaerobios</i> , <i>Aeromonas sp</i>
Tolueno	<i>Methylosinus trichosporium OB3b</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>P. putida</i> , <i>Cunninghamella elegans</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P.mildenberger</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Achromobacter sp.</i> , <i>methanogenos</i> , <i>anaerobios</i>
Etilbenceno	<i>Pseudomonas putida</i>
Xilenos	<i>Pseudomonas putida</i> , <i>methanogenos</i> , <i>anaerobios</i> , <i>Aeromonas sp</i>

Existen estudios en donde se utilizaron microorganismos para degradar compuestos BTEX.

Laleh Yerushailmi (2000) reportó eficiencias de remoción de BTEX entre 98 y 99% utilizando, un biorreactor de lecho empacado de 5L con inóculo 100 mg/L y una concentración de gasolina de 370 mg/L. Los cultivos microbianos mixtos, usados fueron obtenidos de suelos contaminados con gasolina.

A. Rozkov, A. Käär (1998) obtuvo eficiencias de remoción de BTEX de 99% utilizando un quimiostato de 2L operado a la mitad, con un inóculo 1:10 y una tasa de dilución 0.1 h⁻¹. Los cultivos microbianos mixtos usados fueron obtenidos de aguas contaminadas con gasolina.

Acuña-Askar M.A. de la Torre-Torres (2004, 2005 y 2006), reportó eficiencias de remoción entre 55-100% utilizando reactores de 2 L con 560 mL de medio

mineral, 2 mL de biomasa con concentración de 800mg/L y 50 ppm de BTEX. Se utilizaron cultivos microbianos mixtos, obtenidos de suelos contaminados con gasolina.

Ç. Barbaarslan, T. Abuhamed (2003) reporto eficiencias de remoción de BTEX entre 54-100% utilizando biorreactores en lote con 160 mL, 2340 mg/L de inóculo y 20 mg/L de BTEX. Se utilizaron cultivos microbianos mixtos, provenientes de aguas contaminadas con petróleo.

Tabla 5. Tasas de degradación y % de remoción para BTEX obtenidas en diferentes estudios.

compuesto	Tasa de degradación (mg/h*mg _{biomasa})	% de remoción	Referencia
o-Xileno	2.96X10 ⁻⁵	45	Ç. Barbaarslan, <i>et al.</i> , 2003
Tolueno	1.77EX10 ⁻⁵	100	
Benceno	1.77EX10 ⁻⁴	55	
o-Xileno	1,78EX10 ⁻⁴	90,1	A. Acuña Askar <i>et al.</i> , 2004
tolueno	2,37EX10 ⁻⁴	99,2	
Benceno	1,75EX10 ⁻⁴	99,3	A. Acuña Askar <i>et al.</i> , 2005
o-Xileno	1,05EX10 ⁻⁵	99,8	
tolueno	6,23EX10 ⁻⁶	99,8	
Benceno	1,20EX10 ⁻⁵	99	A. Acuña Askar <i>et al.</i> , 2006
o-Xileno	1,24EX10 ⁻⁶	18,7	
tolueno	1,92EX10 ⁻⁶	98,1	
Benceno	1,69EX10 ⁻⁶	78,8	
Mezcla de BTEX	2.25EX10 ⁻³	98-99	Laleh Yerushailmi, <i>et al.</i> .,2000
Mezcla de BTEX	8.22EX10 ⁻³	99	A. Rozkov, <i>et al.</i> , 1998

4. MTBE

El MTBE se produce industrialmente mediante procesos químicos de síntesis a partir del metanol e isobutileno (*Garfias y Gutiérrez 2003*). La fórmula química condensada del MTBE es $\text{CH}_3\text{OC}(\text{CH}_3)_3$, su conformación molecular se presenta en la figura 5.

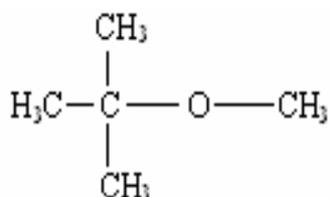


Figura 5. Fórmula del MTBE

El MTBE es un líquido incoloro, con un olor similar al del aguarrás, tiene un punto de ebullición de 55.2°C y su densidad es de 0.743 g/cm^3 . Se le considera químicamente estable, es volátil, inflamable y explosivo (*Lesser 2002*).

Solubilidad en el agua. La solubilidad del MTBE puro en el agua se reporta entre 48 mil y 51 mil mg/L, dependiendo de la fuente de información. El MTBE es cerca de 30 veces más soluble en agua en comparación con el benceno y casi 100 veces más soluble que el tolueno. La alta solubilidad del MTBE está dada por la disposición del grupo éter en su molécula, que le confiere un "momento dipolar" debido al par de electrones que están asociados al átomo de oxígeno. Esto hace que el MTBE se comporte como un compuesto ligeramente "iónico" a diferencia de los hidrocarburos contenidos en la gasolina, que por naturaleza son no-polares (*Lesser, 2002*).

Considerando que la gasolina contiene aproximadamente 10 % en volumen de MTBE y que el límite de contaminación es de 0.04 mg/L (*EPA 2000*), se tiene que el MTBE contenido en un litro de gasolina puede contaminar aproximadamente 185 m^3

Difusión en el agua. El MTBE tiene un coeficiente de difusión en agua casi diez veces mayor al del benceno. Lo anterior contribuye al incremento en el tamaño de las manchas de contaminación en agua subterránea comparado con lo que ocurriría si se tratara de benceno (*Lesser 2002*).

4.1 Empleo de MTBE en gasolinas de México

El uso de MTBE en las gasolinas mexicanas se analizó a finales de 1990 con la aparición en México de vehículos equipados con convertidores catalíticos. Estos vehículos fueron producidos como respuesta, a la demanda de las autoridades ambientales para armar unidades automovilísticas que dejarán de usar gasolinas con plomo debido a los problemas ambientales que causaba el uso de este compuesto. Para ello se introdujeron en el país las gasolinas Magna Sin y Premium, ambas de mayor octanaje, en donde se determinó por pruebas realizadas en el laboratorio de motoquímica del Instituto Mexicano del Petróleo utilizar concentraciones de 5 y 11% de MTBE en volumen (Garfias y Gutiérrez, 2003).

4.2 Efectos en la salud del MTBE

En un principio el problema de contaminación por MTBE en agua se detectó por el cambio en el sabor y olor en esta, por lo que se empezó a hacer estudios de inhalación e ingesta de MTBE en los EUA (EPA 2000). En un estudio realizado en los Estados Unidos se reporta que por la ruta de la inhalación, el MTBE a altas dosis ha causado efectos de salud como cáncer así como tumores en una variedad de órganos (EPA 2000). En otro estudio realizado por la EPA en marzo del 2000, se sometieron a un grupo de animales a una dosis diaria de MTBE en aceite de oliva, el efecto obtenido fue la presencia, carcinomas en varios órganos en un alto nivel de la exposición. (EPA, 2000).

Los metabolitos que se forman por la degradación del MTBE son el formaldehído y alcohol terbutílico. EPA señala que “aunque útiles para identificar riesgos potenciales, las limitaciones de los estudios no permiten estimar confiablemente el grado de riesgo del MTBE que pudiera representar a los humanos por la contaminación de bajo nivel de agua potable” (EPA 2000).

Por lo que respecta a su potencial cancerígeno, EPA concluyó en diciembre de 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 en riesgo”. (EPA, 2000).

El Instituto de Efectos en la Salud concluyó en febrero de 1996 que son “preocupantes los efectos observados sobre el sistema motor de humanos 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 EPA aun sigue realizando estudios para verificar si el MTBE tiene efectos carcinogénicos en el hombre (EPA 2007).

4.3 Contaminación de agua por MTBE

Existen diversos estudios de campo que evaluaron los niveles de contaminación de los mantos acuíferos por MTBE; la mayoría de ellos realizados en los Estados Unidos (EPA 2000).

El problema particular que presenta el MTBE en las fugas consiste en que este compuesto, a diferencia de otros hidrocarburos de gasolina el MTBE es muy soluble con la fase acuosa hasta con 50,000 mg/L (ppm) y que casi no se absorbe en el suelo por lo que es transportado por el flujo de agua hasta los mantos freáticos (Buenrostro & Dovali 2001).

En el caso de nuestro país, existe sólo un estudio para la Ciudad de México y unos pocos para algunos estados del país de los niveles de contaminación de suelos y aguas para consumo humano y residuales por MTBE causados por derrames o fugas de gasolina (Buenrostro & Dovalí 2001). Los resultados del primero se muestran en la tabla 6.

Tabla 6- Monitoreo de MTBE en la ciudad de México 2001 (Buenrostro y Dovalí, 2001).

Sitio analizado	No de gasolineras	No de Gasolineras con presencia de MTBE	Concentración máxima del MTBE (mg/L)
Suelo de las gasolineras	54	40	52.1
Agua freática bajo la gasolinera	47	39	87
Drenaje alrededor de la gasolinera (agua residual)	48	34	3.96
Gasolinera en la zona de recarga del acuífero	suelo	7	5.58
	Agua freática	7	7.22
Descarga de aguas residuales en las gasolineras	Drenaje	58	46
	Suelo	4	4
			6.04

Una de las principales fuentes de contaminación por MTBE en agua subterránea, fue la existencia de fugas en los tanques de almacenamiento de gasolinas en el estado de California en el 1999 (EPA 2000). En una nota publicada en 1993 por la EPA se informó que mas de 170 mil tanques subterráneos presentaron fugas en EUA, o sea, mas del 37% del total evaluado (Garfias y Gutiérrez 2003).

En México, PEMEX-Refinación implantó en la década de los 90's un programa de modernización de estaciones de servicio, mediante concesiones de franquicia PEMEX, para que se instaláran tanques de doble pared, con monitores para la detección de fugas en los depósitos de combustibles, la operación de dispensarios con sistemas de corte rápido de flujo en mangueras, e interruptores de emergencia entre otros (Garfias y Gutiérrez 2003).

4.4 Biodegradación de MTBE

La biodegradación del MTBE puede ser anaerobia o aerobia y se lleva a cabo por distintos microorganismos (Fiorenza & Rifal, 2003). No todos los microorganismos pueden degradar al MTBE hasta su mineralización completa (CO_2), ya que este compuesto es muy estable debido al enlace éter y al átomo de carbono terciario que contiene. (Fiorenza 2003) En la figura 6 se muestra la ruta de degradación del MTBE.

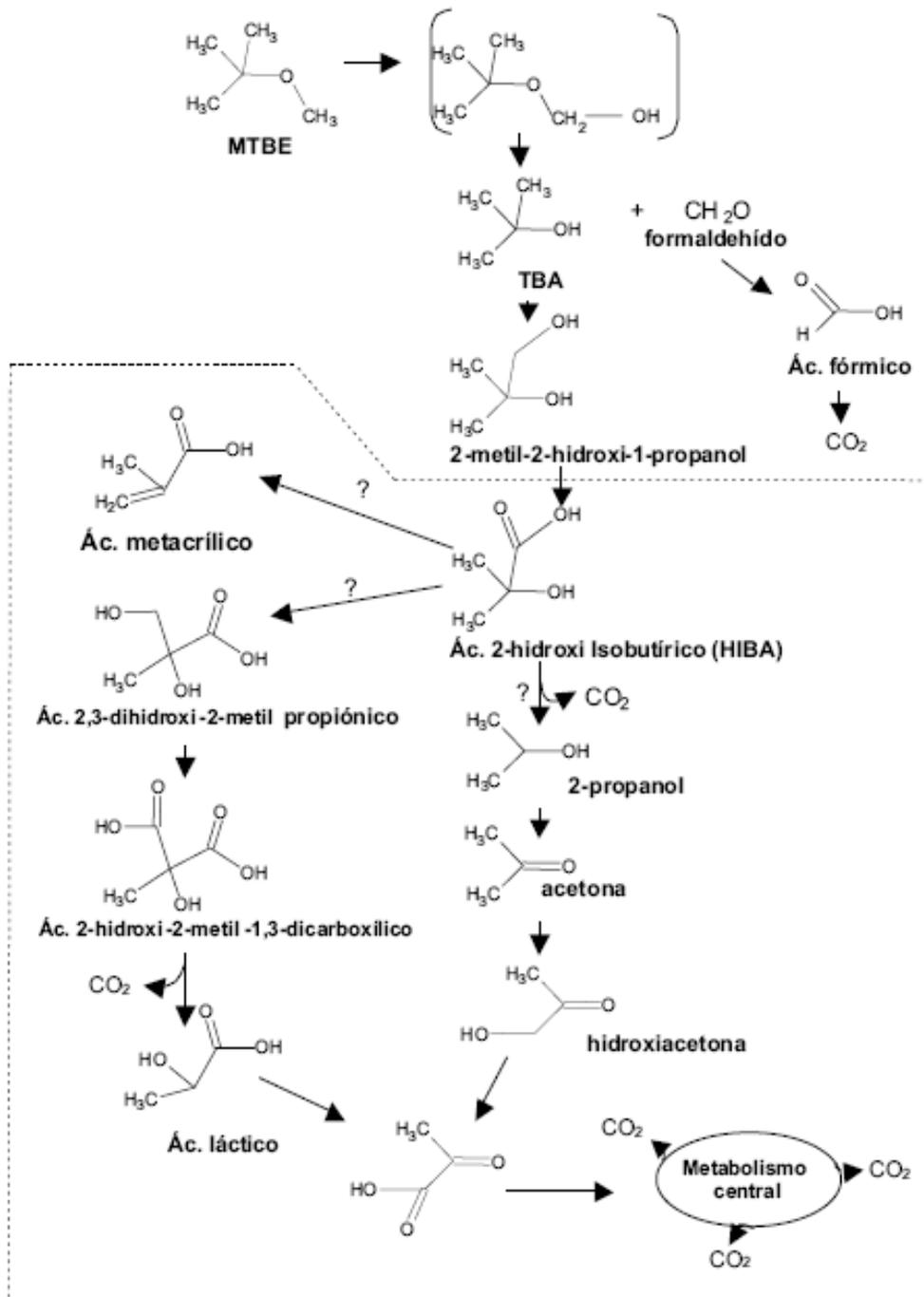


Figura 6. Ruta metabólica propuesta para la degradación de MTBE por una bacteria oxidante de propano (Steffan et al., 1997).

Se han identificado microorganismos que pueden utilizar al MTBE como única fuente de carbono y energía (tabla 7).

Tabla 7. Tasas de degradación observadas con diferentes cultivos, puros y mixtos en condiciones aerobias (adaptado de Fiorenza & Rifal, 2003)

Organismo (s)	Tasa de degradación de MTBE	Rendimiento Celular	Referencia
<i>Rubrivivax gelatinosus</i> PM1 2 X 10 ⁶ células/mL	1.3 x 10 ⁴ , 7.4 x 10 ⁵ nmol/min/mL	0.18 mg células/mg MTBE	Hanson et al., 199
<i>Hydrogenophaga flava</i> F55 25 mgMTBE/L	0.45 mg/h/mg de proteína, 30° C, crecida en extracto de levadura	0.4 mg/mg MTBE	Hatzinger et al., 2001
<i>Mycobacterium austroafricanum</i>	0.011 mg/h/mg proteína	0.44 mg/mg MTBE	Francois et al.,2002
MC-100 cultivo mixto o BC1	0.068 mg/h/mg proteína	0.21 - 0.28 mg peso seco/ mg MTBE	Salanitro et al.,

Otros microorganismos son capaces de utilizarlo mediante una estrategia cometabólica, es decir utilizan un compuesto alternativo (generalmente alcanos) como fuente de carbono y la actividad metabólica se aprovecha también para oxidar al MTBE (Nava et al., 2007). En la tabla 8, se presentan algunos microorganismos que degradan MTBE siguiendo la estrategia cometabólica.

Tabla 8. Microorganismos capaces de degradar MTBE en cometabolismo.
(Adaptado de Stephanie Fiorenza & Rifai., 2003).

Microorganismo(s)	Fuente de carbono	Tasa de degradación de MTBE y TBA	Referencia	
Cultivo mixto		1,55X10 ⁻⁴ mg/h/mg proteína	Acuña et al., 2004	MTBE
Cultivo mixto		3,09X10 ⁻⁶ mg/h/mg proteína	Acuña et al., 2005	
Cultivo mixto		9,25X10 ⁻⁵ mg/h/mr proteína	Acuña et al., 2006	
<i>Graphium sp</i>	n-butano	1.3X10 ⁻⁴ mg/h/mg proteína	Hardison <i>et al</i> 1997	
ENV 425	propano	2.4X10 ⁻³ mg/h/mg proteína	Steffan <i>et al.</i> , 1997	
ENV 421	propano	4.8X10 ⁻³ mg/h/mg proteína	Steffan <i>et al.</i> , 1997	
<i>Xanthobacter sp</i>	propano	0.026 mg/h/mg proteína	Garnier <i>et al.</i> , 1998	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	pentano	2X10 ⁻³ mg/h/mg proteína	Garnier <i>et al</i> 1999	
<i>Arthrobacter (ATCC 27778)</i>	butano	3.5x10 ⁻³ mg/h/mg proteína	Liu <i>et al.</i> , 2001	TBA
<i>R. gelatinosus PM1</i>		0.02 mg/h/mg proteína	Deeb <i>et al</i> 2001	
<i>Rhodococcus ruber</i>		4.3X10 ⁻³ mg/h/mg proteína	Hernández Pérez <i>et al.</i> , 2001	
<i>Mycobacterium vaccae</i>	propano	5.6X10 ⁻³ mgl/h/mg proteína	Hyman <i>et al.</i> , 1998	

Las ventajas de tener microorganismos que puedan usar al MTBE como única fuente de carbono, es que estos pueden degradarlo directamente sin adicionar otra fuente de carbono (metabolismo directo de MTBE), las desventajas es que existen menos microorganismos que realizan metabolismo directo, y los microorganismos que realizan este tipo de metabolismo tienen bajos rendimientos de biomasa. Con la estrategia cometabolica, primeramente se degrada el compuesto adicionado (alcanos) y posteriormente se degrada el MTBE (metabolismo indirecto de MTBE), sin embargo existen mayor cantidad de microorganismo que utilizan esta estrategia y estos presentan mayores rendimientos de biomasa.

La mayor parte de microorganismo o consocios microbianos, para degradación de MTBE, se han obtenido de: aguas y suelos contaminados con gasolina o petróleo, lodos activados etc. Estos microorganismos presentan las mismas desventajas que para los compuestos BTEX. Para MTBE en muchos casos se han detectado problemas de degradación incompleta para este compuesto.

Aunque existen diferentes microorganismos capaces de degradar MTBE (directamente o en cometabolismo) se ha reportado que generalmente la oxidación es parcial, por lo que ocurre acumulación de alguno de los intermediarios de la ruta metabólica de degradación del MTBE por ejemplo: TBA (alcohol terbutílico), diol (2-metil-2-hidroxi-1-propanol) ó HIBA (ác. 2-hidroxi isobutírico) (Nava et al., 2007).

5- Justificación del Proyecto

Se ha demostrado que la bioremediación de BTEX y MTBE es un proceso factible, pero un reto importante es la obtención de microorganismos capaces de usar dichos compuestos como única fuente de carbono, que tengan velocidades de crecimiento altas, que puedan soportar concentraciones elevadas de BTEX o MTBE y que oxiden por completo a estos compuestos.

Los microorganismos que se han utilizado hasta ahora en estrategias de bioremediación de sitios contaminados con hidrocarburos muestran problemas como: largos periodos de adaptación, bajas tasas de degradación, inhibición por sustrato etc. Por lo que es necesario explorar otras fuentes de microorganismos, se han realizado estudios de bioprospección de sitios sujetos a ambientes extremos en donde no se ha reportado la existencia de microorganismos, uno de estos sitios son los sistemas de transporte de hidrocarburos o petróleo.

En este trabajo se plantea la bioprospección bacteriana aerobia de muestras de sedimentos orgánicos de sistemas de transporte de gasolina, y el aislamiento de bacterias aerobias capaces de utilizar compuestos de interés ambiental tales como: BTEX, MTBE y TBA como única fuente de carbono.

Los microorganismos presentes en los sedimentos orgánicos de los sistemas de transporte de gasolina han estado en contacto permanente con los componentes de la misma, por lo que se plantea que no necesitan de largos periodos de adaptación y pueden soportar concentraciones altas de BTEX y MTBE.

Se ha reportado que los microorganismos que degradan Benceno pueden degradar fácilmente a el Etilbenceno, y el isómero de xileno que mas dificultad tiene para ser biodegradado es el o-Xileno, Por otra parte el intermediario que mas se acumula en la ruta de degradación de MTBE es el TBA. Por estas razones se busco únicamente microorganismos que degraden: Benceno, Tolueno y o-Xileno (BTX's), MTBE y TBA.

6- Objetivos

6.1 *Objetivo general*

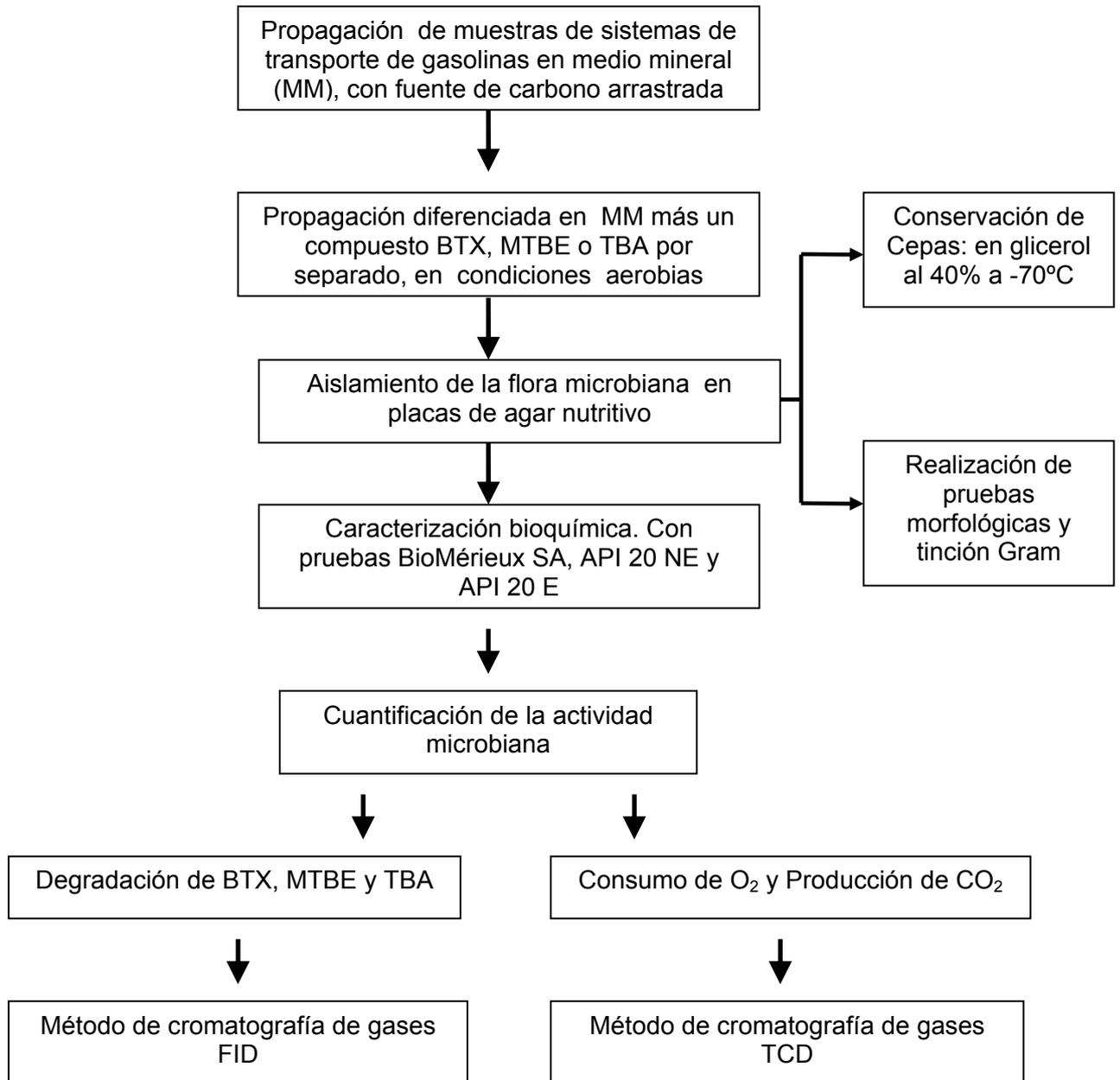
- Asilar y caracterizar cepas bacterianas aerobias capaces de degradar Benceno, Tolueno, o-Xileno, MTBE y TBA a partir de muestras de sedimento orgánico de sistemas de transporte de gasolina.

6.2 *Objetivos Particulares*

- Aislar cepas bacterianas aerobias a partir de muestras de sedimento de sistemas de transporte de gasolina capaces de crecer en Benceno, Tolueno, o-Xileno (BTX's), Metil tert-Butil Éter (MTBE) o Alcohol Tertbutilico (TBA)
- Caracterizar bioquímicamente a las cepas bacterianas aisladas
- Determinar la eficiencia de remoción de cada cepa bacteriana aislada mediante ensayos en lote

7. Estrategia experimental

7.1 Esquema de la metodología



7.2. Metodología

7.2.1 Origen de los cultivos

Los cultivos iniciales (denominados M1-IMP a M13-IMP) provenían de 13 diferentes puntos de muestreo de sedimentos orgánicos de sistemas de transporte de gasolinas. Los cultivos iniciales contenían 1g de muestra en 20 ml de medio mineral (MM).

7.2.2 Propagación y aislamiento de los consorcios M1-IMP a M13-IMP

Los cultivos mixtos M1-IMP a M13-IMP se propagaron por separado en matraces de procultivo, que contenían 50 mL de MM estéril cuya composición se muestra en la tabla 10, más 3 mL del consorcio microbiano, sin adición de fuente de carbono. El pH del medio se ajustó a 7.

Los matraces se incubaron a una temperatura de 30 °C, en un cuarto de temperatura controlada, se mantuvieron en agitación a 100 rpm en una agitadora orbital. Durante 3 días.

Terminado este tiempo de incubación, se realizó una propagación diferenciada, en donde a cada matraz de los consorcios M1-IMP a M13-IMP se les propagó por separado con los cinco compuestos de interés ambiental: benceno, tolueno, o-xileno, MTBE y TBA. Teniendo un total de 65 cultivos, los cuales se realizaron en botellas serológicas de 50 mL estériles, adicionándoles 20 mL de MM estéril, 3 mL de inóculo mas 100 ppm del compuesto de interés ambiental (BTX, MTBE o TBA), las botellas se taparon con tapones de viton estériles y se incubaron durante 5 días de acuerdo a las condiciones anteriores.

Terminado el tiempo de incubación de la propagación diferenciada, se realizó el aislamiento de microorganismo por medio de la técnica de estría cruzada en placas de agar nutritivo, cuya composición se muestra en la tabla 9 Se realizaron aproximadamente de 4 a 5 traspasos en placas de agar nutritivo para obtener las cepas puras. Entre cada traspaso se realizaron, observaciones al microscopio con la técnica de Gram para comprobar la pureza de la cepa y también se determinó la morfología microscópica.

Tabla 9. Composición de agar nutritivo

Compuesto	(g/L)
Peptona de gelatina	5
Extracto de carne	3
Agar	15
pH final de 6.9	

Una vez que se obtuvieron las cepas en las placas de agar nutritivo, se prosiguió con una nueva propagación del microorganismo puro en MM tabla 10 mas BTX, MTBE o TBA según la procedencia de la cepa, esto se realizó en botellas serológicas de 50 mL estériles, mas 20 mL de MM estéril, inoculando con 2 o 3 azadas de la cepa en la caja petri, más 90 ppm de BTX, MTBE o TBA según sea el caso, se taparon con tapones de vitón estériles y se incubaron durante 5 días con las condiciones anteriores. A estos cultivos se le realizaron 6 trasposos cada 10 días aproximadamente para mantener las cepas con una viabilidad constantes, en cada trasposo de la cepa a medio nuevo se le realizaron pruebas morfológicas para asegurar la pureza del cultivo.

Tabla 10. Composición de Medio Mineral utilizado para la propagación de las cepas

Compuesto	Concentración (g/L)
K_2HPO_4	2
KH_2PO_4	1
NH_4Cl ,	0.75
$MgSO_4$	0.5
$CaCl_2$	0.018
Solución de oligoelementos traza (tabla 11)	1 mL

Tabla 11. Composición de la solución de oligoelementos traza (Fortín y Deshusses 1999)

Compuesto	Concentración (g/L)
HCl	6.76 mL
FeCl ₃	1.59
H ₃ BO ₃	0.06
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.1
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.12
ZnCl ₂	0.07
NiCl ₂ ·2H ₂ O	0.025
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.015
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.025
EDTA (Na ₄ CH ₂ O) ₄	5.2

Nota: Solución de oligoelementos se ajusta a un pH de 4.2, con una solución de NaOH 1M.

7.2.3 Conservación de cepas

Conservación de cepas en glicerol al 40% a -70°C

Se sembraron cajas petri con agar nutritivo, y se inocularon con las cepas crecida en MM y se les adicionó sustrato específico BTX o MTBE según el caso, estas se encubaron a 30°C durante un tiempo de 15 horas como máximo. Posteriormente se prepararon tubos criogénicos de 1.5 mL y se adicionaron 0.9 mL de MM estéril y 0.6 mL de glicerol estéril, los tubos criogénicos se inocularon con aproximadamente 3 azadas tomadas de los cultivos de las cajas petri, se homogenizaron por medio de un vórtex y se refrigeraron a -70°C, realizando pruebas de viabilidad durante periodos de tiempo de aproximadamente 3 mes.

7.2.4 Preparación del inóculo

Los concentrados celulares se prepararán de la siguiente manera:

Las células de las cepas puras crecidas en MM se recuperaron por separado centrifugando el volumen total de las botellas serológicas de con 10 días de crecimiento a 10000 rpm durante 30 min. La pastilla de células se lavo con medio mineral estéril dos veces y se recupero por centrifugación a 10000 rpm durante 30 min., al final de los lavados el pellet se resuspendió en 20 mL de medio mineral estéril. A este concentrado celular se le determino la concentración de proteínas por el método descrito en la sección 7.2.6.1

Conociendo la concentración de proteína en el concentrado celular se determino el volumen del inóculo para las cinéticas de biodegradación.

7.2.5 Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas se realizaron mediante kits estandarizados de la marca BioMérieux SA, de acuerdo a las pruebas API 20 NE que es un sistema de identificación de bacilos Gram negativos no Enterobacterias y no fastidiosos, también se realizarán la prueba API 20 E que es un sistema de identificación de Enterobacterias y otros bacilos Gram negativos no exigentes.

. Tabla 12. Pruebas bioquímicas API 20 NE

Prueba bioquímica	Abreviatura	reacción
reducción de nitratos	NO3	reducción de nitratos
triptófano	TRP	degradación de triptofano hasta indol
glucosa	GLU	fermentación de glucosa
arginina deshidrolasa	ADH	producción de arginina deshidrolasa
urea	URE	hidrólisis de la urea
hidrólisis de esculina	ESC	hidrólisis de esculina
proteasá	GEL	hidrólisis de gelatina
β -galactosidasa	PNPG	Producción de β -galactosidasa
Glucosa	GLU	asimilación de glucosa
arabinosa	ARA	asimilación de arabinosa
manosa	MNE	asimilación de manosa
manitol	MAN	asimilación de manitol
N-acetil-glucosamina	NAG	asimilación de N-acetil-glucosamina
maltosa	MAL	asimilación de maltosa
glucanato	GNT	asimilación de glucanato
caprato	CAP	asimilación de caprato
adipato	ADI	asimilación de adipato
malato	MLT	asimilación de malato
citrato	CIT	asimilación de citrato
fenil acetato	PAC	asimilación de fenil acetato
oxidasas	OX	producción de oxidasas

Tabla 13-Pruebas bioquímicas API 20 E

Prueba bioquímica	Abreviatura	Reacción
β-galactosidasa	ONPG	producción de β-galactosidasa
arginina deshidrolasa	ADH	producción de arginina deshidrogenasa
lisina descarboxilasa	LDC	descarboxilación de lisina
ornitina descarboxilasa	OCD	descarboxilación de ornitina
citrato	CIT	asimilación de citrato
ácido sulfúrico	H ₂ S	producción de H ₂ S
urea	URE	hidrólisis de urea
triptófano desaminasa	TDA	asimilación del triptófano
indol	IND	producción de indol
Voges-Proskauer	VP	producción de acetoina
proteasa	GLE	hidrólisis de gelatina
Glucosa	GLU	fermentación de glucosa
manitol	MAN	fermentación de manitol
inositol	INO	fermentación de inositol
sorbitol	SOR	fermentación de sorbitol
ramosa	RHA	fermentación de ramosa
sacarosa	SAC	fermentación de sacarosa
melobiosa	MEL	fermentación de melobiosa
amigdalina	AMY	fermentación de amigdalina
arabinosa	ARA	fermentación de arabinosa
oxidasa	OX	producción de oxidasas

Todo el procedimiento se realizará de acuerdo a las especificaciones de los manuales de dichas pruebas.

7.2.5.1 Interpretación de las pruebas bioquímicas

La identificación de los organismos con el sistema API y el sistema 32 ID de identificación, se realiza mediante dos elementos que componen un sistema de identificación global para BioMérieux:

- La banda de pruebas bioquímicas, que permite a un grupo de resultados que se esperan obtener para cada organismo probado (igual q perfil bioquímico).
- La base de datos creada con los taxones y porcentajes de positividad de cada prueba.

El porcentaje de identificación (%ID) es el resultado estadístico de la comparación de varios taxones, dicho porcentaje de identificación para que sea aceptable debe de ser mayor al 80 %

Los valores que proporciona el sistema de identificación con base a la exactitud del %ID del microorganismo probado son los siguientes:

EXCELENTE IDENTIFICACIÓN %ID \geq 99,9
MUY BUENA IDENTIFICACIÓN % ID $>$ = 99,0
BUENA IDENTIFICACIÓN % ID $>$ = 90,0
IDENTIFICACIÓN ACEPTABLE % ID $>$ = 80,0

La identificación es "no fiable" si la suma de las propuestas ID% es menos de 80,0. Por lo tanto un taxón tiene varias pruebas en contra de la identificación, y el sistema propone varios taxones a los cuales les asigna valores de identificación menores del 80%. Estos valores se pueden deber a un perfil atípico o un error de lectura o de codificación.

7.2.6 Cinéticas de biodegradación de BTX's, MTBE y TBA

Se realizaron cinéticas de biodegradación de BTX's, MTBE y TBA, con las cuales se determinó las tasas de degradación y los % de remoción de los compuestos BTX's, MTBE y TBA con las cepas obtenidas, por separado.

7.2.6.1. Cinéticas de biodegradación

Las cinéticas de biodegradación se realizaron por triplicado en botellas serológicas. A las botellas estériles de 120 mL se les adiciono 20 mL de MM estéril y como inóculo con un volumen tal de los concentrados celulares de las cepas de los compuestos BTX's, MTBE y TBA para tener una concentración inicial de proteína de 20 mg /L. Las botellas inoculadas se sellaron con tapones de vitón y arillos metálicos.

Finalmente se inyectaron 2 μ L de BTX, MTBE o TBA grado analítico (respectivamente) del reactivo concentrado en fase líquida con una jeringa de vidrio para cromatografía de líquidos enfriada (10 μ L de capacidad, marca Hewett packard), para obtener una concentración final de 80 ppm (\pm 10 ppm) aproximadamente de BTX's, MTBE o TBA.

Los frascos se incubaron en una agitadora orbital a una temperatura de 30°C (\pm 2°C) y una agitación de 100 rpm, durante un tiempo de dos semanas.

Durante el periodo de incubación se tomaron muestras líquidas de 200 μ L cada 2 o 3 días para la cuantificación de MTBE y TBA y muestras de la fase gaseosa de 0.5 mL (headspace) para la cuantificación de los BTX's y CO_2 producido.

7.2.6.2 Muestreo

Fase gas: De cada frasco se tomo una muestra de 0.5 mL de la fase gaseosa (espacio de cabeza), con una jeringa de insulina (Plastipak) de 1 mL para medir la degradación de BTX's y la producción de CO_2 . El muestreo se realizo cada 2 días en los primeros 7 días, despues se dejo de monitorear por un lapso de 5 días y se continuará monitoreando cada 2 días, durante un tiempo total de 14 días.

Fase líquida: De cada frasco se tomaron muestras de 1 mL con una jeringa de plástico estéril (Plastipack). La muestra se coloco en insertos de 200 μ L de capacidad y estos en viales eppendorf de 1.5 ml que se colocaron en el automuestreador del cromatógrafo de gases para determinar la concentración de MTBE y TBA. El muestreo se realizo cada 2 o 3 días, durante un periodo de 14 días.

8.2.7 Análisis Fisicoquímicos

8.2.7.1- Cuantificación de proteína

Para la cuantificación de la proteína se utilizo el método Bradford (1976), el cual se basa en la unión de un colorante (Comassie Blue G-250) a las proteínas, y se forma un complejo proteína-colorante, el cual es medido por espectrofotometría de UV/VIS.

Reactivos:

- Albúmina de Suero Bovino (BSA)
- Reactivo de Azul de Coomassie (BIORAD 500-0006)
- Solución salina 0.085 %
- Solución de NaOH 0.1 N.

Procedimiento para las muestras y curva patrón

Muestras:

Centrifugar el volumen de muestra del cultivo durante 15 min a 10,000 rpm durante 20 min, se resuspendio en 10 mL de MM, de esta suspensión se tomo

100 μL y se colocó en viales ependorf de 1.5 mL, que contenían 500 μL de NaOH 0.1 N y 400 μL de solución salina al 0.085%, se mezcló en vortex. La mezcla se sometió a ebullición durante una hora. Se retiraron los tubos de ebullición y se dejó enfriar a temperatura ambiente. De la mezcla fría se tomaron 750 μL y se colocaron en un tubo de ensaye, se adicionaron 250 μL del reactivo Azul de Coomassie (BioRad). Se agitó en vortex y se leyó en un espectrofotómetro de UV-visible Termo Spectronic Helios a 595 nm. La lectura se efectuó entre 5 y 30 minutos después del inicio de la reacción

Curva patrón:

La curva patrón se preparó a partir de una solución stock de albúmina de suero bovino, se realizaron diluciones para obtener concentraciones de 10 a 40 mg/L de proteína. A diferencia de las muestras, la BSA no es sometida al proceso de hidrólisis, pero se siguió el procedimiento de las muestras. Se construyó la curva patrón de concentración de Proteína vs Absorbancia, la cual fue utilizada para calcular la concentración inicial de proteína en las muestras.

8.2.7.2- Cuantificación de MTBE y TBA en fase líquida

Preparación de la muestra:

Para analizar al MTBE y TBA, se tomaron 200 μL de la fase líquida de las cinéticas de biodegradación y se colocaron en un vial para cromatografía con inserto. Se analizaron las concentraciones de MTBE y TBA en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard HP 6890 con detector de ionización de flama, equipado con una columna capilar Alltech AT1000, cuyas condiciones de operación fueron las siguientes.

- Helio como gas de arrastre con flujo de 25 mL/min,
- Temperatura del inyector 180°
- Temperatura del horno 40°C
- Temperatura del detector 275°C
- Flujo de hidrógeno y de aire: 30 y 300 mL/min, respectivamente.
- Volumen de muestra inyectada: 2 μL

Curva patrón

Se preparó una curva patrón de MTBE y TBA, realizando soluciones con concentración de 10 a 90 mg/L, se distribuyeron en los viales de cromatografía y

se analizan igual que las muestras. Se construyó la curva patrón de concentración de MTBE vs Área y TBA vs Área, la cual se utilizó para calcular la concentración de estos compuestos en las muestras

8.2.7.3- Cuantificación de BTX's en fase gas

De cada frasco se tomo una muestra de 0.1 mL de la fase gaseosa (espacio de cabeza), con una jeringa de insulina para medir la desaparición de BTX's, la cual se cuantifico en un cromatógrafo de gases, Agilent 8550 (Series GC System), con detector de ionización de flama equipado con una columna HP-1 cuyas condiciones de operación fueron las siguientes.

- Helio como gas de arrastre con flujo de 25mL/min.
- Temperatura del inyector 180°
- Temperatura del horno 40°C
- Temperatura del detector 250°C
- Flujo de hidrógeno y de aire: 30 y 300 mL/min. respectivamente.
- Volumen de muestra inyectada: 100 µL fase gas

Curva patrón

Se prepararon curvas patrón a partir de benceno, tolueno y o-xileno, con concentraciones de 10 a 90 mg/L, y se analizaron en el cromatógrafo. Se construyó la curva patrón de concentración de BTX's vs Área, la cual fue utilizada para calcular la concentración de estos compuestos en los frascos de experimentación.

8.2.7.4- Cuantificación de Dióxido de carbono

De cada frasco, se tomo una muestra de 1 mL de la fase gaseosa (espacio de cabeza), con una jeringa de insulina (Plastipack) para medir la producción de Dióxido de Carbono, la cual se cuantifico en un cromatógrafo de gases, GOW-MAC 580 con un detector de conductividad térmica equipado con una columna ALLTECH CTR1 (concéntrica de 6' X 1/4" exterior y 6' X 118" interior) cuyas condiciones de operación fueron las siguientes.

- Helio como gas de arrastre con flujo de 60 mL/min
- Temperatura del inyector 50°C
- Temperatura del detector 115°C
- Temperatura del la columna 40°C
- Detector de corriente 125 mA

Cálculo en mg de CO₂

Al inyectar la muestra de la fase gaseosa en el cromatógrafo GOW-MAC 580 este da como resultado los porcentajes de los diferentes gases que componen la muestra en un volumen de 1 mL, entre los gases está el CO₂, al multiplicar el porcentaje de CO₂ que existe en 1 mL por el volumen total que ocupan los gases en la botella serológica, se obtiene el volumen total de CO₂ que existe en la botella serológica en ese momento. Para obtener los moles de CO₂ existentes utilizamos la fórmula de los gases ideales:

$$PV := nRT$$

$$n := \frac{P \cdot V}{R \cdot T}$$

Donde:

- P= presión en (atm)
- V= volumen en (L)
- n= moles
- R=Constante de los gases ideales en (atm*L/mol*K)
- T= temperatura en °K

Una vez obtenidos los moles estos se multiplican por el peso molecular de CO₂ y se dividen entre mil y se obtiene los mg de CO₂

8-Resultados

8.1 Obtención de cultivos

Se observó crecimiento en los 13 cultivos originales a los 5 días de incubación (Tabla 14). Posteriormente cuando se realizaron los cultivos con fuente de carbono específica se obtuvieron dos cultivos con crecimiento en base al tolueno, tres con MTBE, uno con Benceno, tres con o-Xileno y cinco con TBA (Tabla 14).

En algunos casos, como el de las muestras originales: 2, 3 y 5, se observó crecimiento microbiano en diferentes medios de crecimiento específico, debido a la mayor variedad de microorganismos presentes en dicha muestra o la mayor capacidad metabólica de los mismos.

Tabla 14- Cultivos específicos obtenidos a partir de los 13 cultivos originales.

Medio de cultivo	Cultivo original												
	M1-IMP	M2-IMP	M3-IMP	M4-IMP	M5-IMP	M6-IMP	M7-IMP	M8-IMP	M9-IMP	M10-IMP	M11-IMP	M12-IMP	M13-MP
MM	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
MM + Tolueno			X			X							
MM + MTBE	X	X			X								
MM + Benceno			X										
MM + o-Xileno			X		X				X				
MM+ TBA		X	X		X		X				X		

X= Crecimiento

MM=medio mineral



(A)



(B)



(C)



(D)

Figuras 8. Cultivos de muestras originales (A), cultivos con crecimiento en medio mineral con Tolueno (B), cultivos con crecimiento en medio mineral con o-Xileno (C) y cultivos con crecimiento en medio mineral con MTBE (D)

8.2 Caracterización morfológica y bioquímica de los cultivos

En el proceso de aislamiento se obtuvieron 18 cepas: 4 que degradan tolueno, 2 que degradan Benceno, 4 que degrada o-Xileno, 4 que degradan MTBE y 4 que degradan TBA. (tabla 15).

Las colonias celulares de las cepas aisladas se evaluaron bajo 11 criterios morfológicos los cuales nos proporcionan elementos para la identificación de los microorganismos obtenidos.

De acuerdo a la tabla 15 muchos de los 11 criterios morfológicos coinciden en varias de las cepas aisladas, lo que posiblemente estos no indique que su pudo obtener de microorganismos que pertenecen al mismo género.



Figura (A) Cultivo M3,2'



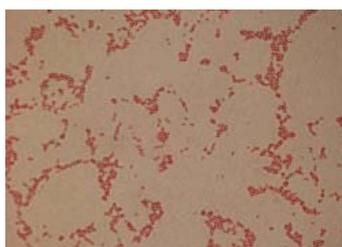
Figura (B) Cultivo M3T'



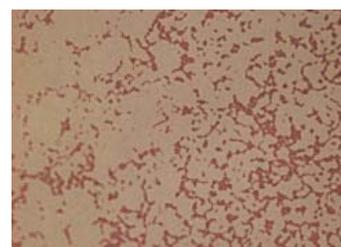
Figura (C) Cultivo M6T



Gram (-) bacilo de cultivo crecido en MM



Gram (-) bacilo de cultivo M3T'



Gram (-) bacilo de cultivo M6T

Figuras 9. Cultivo puro original bacilo (-) (A), cultivo puro de tolueno bacilo (-) (B), cultivo puro de tolueno bacilo (-) (C).

Tabla 15. Características morfológicas de las 18 cepas aisladas

Características Morfológicas											
cepa	Forma microscópica	Gram.	tamaño (mm)	color	Forma	elevación	superficie	Aspecto	Bordes	Consistencia	luz reflejada
M3,1 T	bacilo	-	3	beige	circular	plana	lisa	húmedo	redondos	mucoide	brillante
M 6 T	bacilo	-	3	beige	ovalada	plana	lisa	húmedo	irregulares	firme	Brillante
M3T'	bacilo	-	2	beige	circular	plana	lisa	húmedo	redondos	mucoide	brillante
M3,2 T	bacilo	-	2	amarilla	puntiforme	plana	lisa	húmedo	irregulares	firme	brillante
M3,2 B	bacilo	-	5	beige	ovalada	convexa	rugosa	húmedo	irregulares	firme	brillante
M3,1,1 B	bacilo	-	3	transparente	irregular	plana	rugosa	húmedo	irregulares	mucoide	brillante
M3,1,1 O-X	bacilo	-	3	beige	circular	plana	lisa	húmedo	irregulares	mucoide	brillante
M5,1 O-X	bacilo	-	3>5	amarilla	irregular	irregular	rugosa	seco	irregulares	mucoide	opaca
M9,1 O-X	bacilo	-	1	transparente	irregular	plana	lisa	húmedo	irregulares	firme	brillante
M3,1,2 O-X	bacilo	-	2	amarilla	circular	convexa	rugosa	seco	irregulares	Dura	opaca
M 2,1 MTBE	bacilo	+	3	blanco	irregular	plana	rugosa	seco	regulares	suave	opaca
M1,1' MTBE	bacilo	+	1	blanco	regular	plana	lisa	húmedo	regulares	mucoide	brillante
M5,1 MTBE	bacilo	+	<1	transparente	irregular	plana	lisa	húmedo	irregulares	suave	brillante
M 2 MTBE	bacilo	-	2	blanco	regular	convexa	lisa	húmedo	redondos	suave	brillante
M7,1 TBA	bacilo	-	3	amarilla	regular	plana	lisa	húmedo	regulares	mucoide	brillante
M11,1 TBA	bacilo	-	6	blanco	regular	plana	lisa	seco	regulares	suave	opaca
M 5,1 TBA	bacilo	+	5	beige	irregular	plana	lisa	húmedo	irregulares	mucoide	brillante
M 3,1 TBA	bacilo	-	3	beige	regular	convexa	rugosa	seco	regulares	suave	opaca

Tabla 16. Caracterización bioquímica de las 18 cepas obtenidas en el proceso de aislamiento

CEPA	Sustrato	Taxón	% Identificación con base de datos BioMérieux	Verificación con literatura: Pruebas bioquímicas de MacFadin
M 3,2 B	Benceno	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	99.5	93%
M 3,1,1 B	Benceno	<i>Pseudomonas luteola</i>	99.9	95%
M 3,1 T	Tolueno	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	99.8	93%
M 3,2 T	Tolueno	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	99.6	94%
M 3 T	Tolueno	<i>Aeromonas</i>	54.5%	66%
M 6 T	Tolueno	<i>Vibrio metschnikovii</i>	95.5%	95%
M 3,1,2 O-X	O-xileno	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99.5%	95%
M5,1 O-X	O-Xileno	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	99.5%	93%
M 3,1,1 O-X	O-Xileno	<i>Aeromonas</i>	61%	80%
M 9,1 O-X	O-Xileno	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	99.5%	93%
M 7,1 TBA	TBA	<i>Burkholderia cepacia</i>	99.8%	92%
M 5,1 TBA	TBA	<i>Burkholderia</i>	no confiable	53%
M 11,1 TBA	TBA	<i>Pseudomonas</i>	no confiable	50%
M 3,1 TBA	TBA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.9 %	95%
M 5,1 MTBE	MTBE	<i>Pseudomonas</i>	no confiable	49%
M 2,1 MTBE	MTBE	<i>Vibrio</i>	no confiable	57%
M 1,1' MTBE	MTBE	<i>Aeromonas</i>	no confiable	45%
M 2 MTBE	MTBE	<i>Vibrio / Aeromonas</i>	no confiable	51%

Como se obtuvo un mayor número de microorganismos Gram negativos se utilizaron las pruebas bioquímicas API 20 NE y API 20 E de BioMérieux para bacterias gram negativas no enterobacterias y enterobacterias

Debido a que se obtuvo un mayor número de microorganismos que pertenecen a la familia de los Gram negativos y debido a que en la literatura se reportan microorganismos que degradan BTX's o MTBE y pertenece a bacterias gramnegativas, se tomó la decisión de realizar las pruebas bioquímicas API 20 NE y API 20 E de BIOMÉRIEUX,

De acuerdo con la tabla 16 y los valores establecidos en la sección 7.2.5.1 se obtuvo lo siguiente:

Se identificaron 2 bacterias que pertenece al genero *Pseudomona* con 99.9 % de identificación (%ID), este genero corresponde a las cepas M 3,1,1 B, y M 3,1 TBA, la comprobación con la bibliografía dio como resultado un intervalo de 95% a 97% de concordancia..

Se obtuvieron 8 bacterias 99.0% de identificación las cuales pertenecen al genero de: *Aeromonas* que corresponde a las cepas: M 3,1 T, M 3,2 T, M 5,1 O-X, M 9,1 o-X y M 3,2 B. también identifico el genero *Burkholderia* que corresponde a la cepa M 7,1 TBA, el genero *Vibrio* que corresponde a la cepa M 6 T y el genero *Pseudomona* que corresponde a la cepa M 3,1,2 o-X . Al comparar con la literatura se obtuvieron intervalos de concordancia de 92% a 95%.

También se obtuvieron 2 bacterias con un 80% de identificación las cuales pertenecen al género *Aeromonas* las cepas con este género son: M 3 T y M 3,1,1 o-X. En particular estos resultados se decidieron en base al % de identificación mas alto de todas las probabilidades que proporciono la base de datos BioMérieux, al comparar con la bibliografía se obtuvieron porcentajes de identificación entre 66% y 80%.

Por ultimo se obtuvieron 6 bacterias con un % de identificación “no fiable” las cuales pertenecen a las cepas M 1,1' MTBE, M 5,1 TBA, M 5,1 MTBE, M 2,1 MTBE, y, M 11,1 TBA Las primeras 5 cepas mencionadas tienen en común que son bacterias Gram positivas esto seguramente afecta de manera directa la identificación con las pruebas API 20NE y API 20 E, ya que estas pruebas están diseñadas para bacterias Gram negativas. Por lo que concierne a la cepa M 11,1 TBA aun siendo microorganismos Gram negativos no se tuvieron resultados “no fiables”.

La obtención de algunos resultados no fiables probablemente se deban a que el uso de estas pruebas bioquímicas, están dirigidas para estudios clínicos, y debido al sistema de donde proviene las bacterias a identificar que es un sistema que no se ha estudiado en relación a la búsqueda de microorganismos, pueden ser muchos los factores que intervengan para no obtener una buena identificación con las pruebas API 20NE y 20E en algunos casos, factores tales como: las bacterias a identificar crecen en sustratos no convencionales, proviene de ambientes en condiciones extremas etc.

En los resultados con un % de identificación mayor a 80, se puede confiar en el género del microorganismo, quedando solo como una posibilidad la especie que se muestra en la tabla 16, ya que para discriminar la especie entre dos bacterias del mismo género, se tiene que realizar pruebas moleculares como: la secuenciación de la región 16S del genoma bacteriano o la secuenciación del genoma completo.

En un estudio realizado por Xiang Y. Zhu en el 2003 donde se caracteriza la flora microbiana que existe en un gasodutos, se encontraron bacterias como *Pseudomonas stutzeri* la cual coincide con los resultados en este estudio, esta bacteria tiene requerimientos nutricionales mínimos y a menudo esta presente en medios acuosos que contiene contaminantes como la gasolina y disolventes (Xiang Y. Zhu en el 2003)

En otro estudio realizado por Ç. Babaarslan T. Abuhamed Ü en el 2003 donde se adaptó un consorcio microbiano para realizar la degradación de BTEX se encontró en el consorcio, bacterias del género *Vibrio* como también en este estudio se hallaron bacterias de este género.

La presencia de bacterias del género *Burkholderia* en otros estudios al igual que en este, se encontró en un estudio realizado por Kazuya Watanabe, Kanako Watanabe en el 2000 que consistió en la caracterización de poblaciones bacterianas de aguas contaminadas con petróleo.

El género *Aeromona* se identificó 5 de las cepas que degradan BTX, esto indica que este género tiene una capacidad de crecimiento y adaptación en dichos sustratos

8.3 Cinéticas de Degradación de compuestos BTX's, MTBE y TBA

8.3.1 Cinéticas de degradación de compuestos BTX's

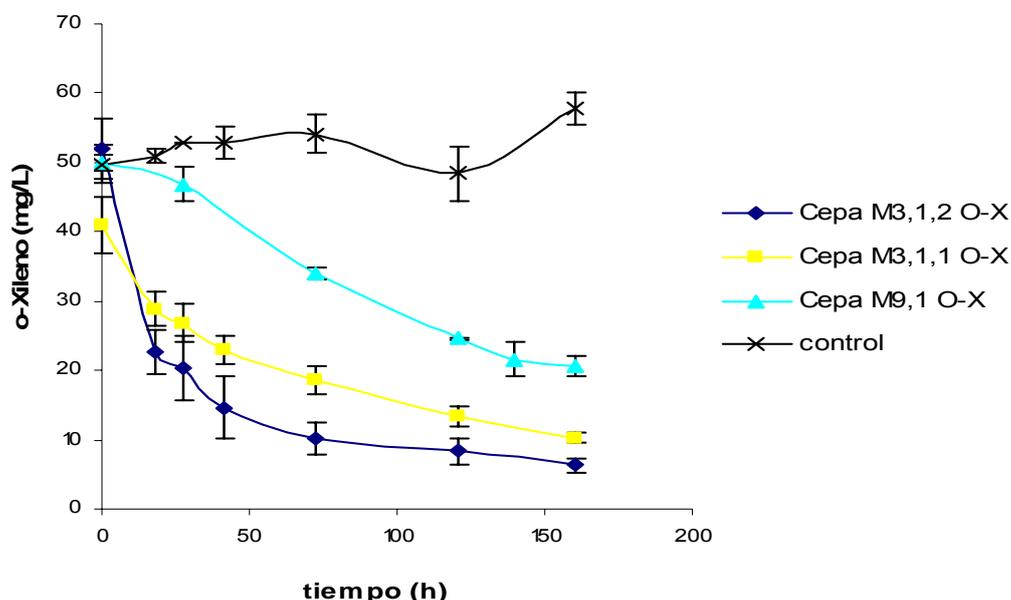


Figura 10. Degradación de o-Xileno con las cepas: M 3,1,2 o-X, M 3,1,1 o-X y M 9,1 o-X

La variación de las concentraciones iniciales de sustrato en las cinéticas de degradación de BTX's se debe a problemas al momento de adicionar el sustrato, ya que los compuestos BTX's tienen la característica de ser muy volátiles, aunque en el momento de realizar la adición se realizó en condiciones frías no se pudo controlar por completo la volatilización

Se obtuvieron tres cepas bacterianas aerobias puras capaces de degradar o-xileno. Las cinéticas de degradación con cada una de las tres cepas mostraron comportamientos similares, la mayor cantidad de o-Xileno removido se observa a las 100 horas para las tres cepas (Figura 10), sin embargo la cepa M 3,1,2 O-X presentó la mayor eficiencia de eliminación de o-Xileno en un 87.96 % seguida de la cepas M 3,1,1 o-xileno con un % de remoción de 75.1% y por último la cepa M 9,1 o-Xileno con un 58.4% de remoción, estas dos últimas cepas pertenecen al género de *Aeromonas* y la primera cepa al género de *Pseudomonas*.

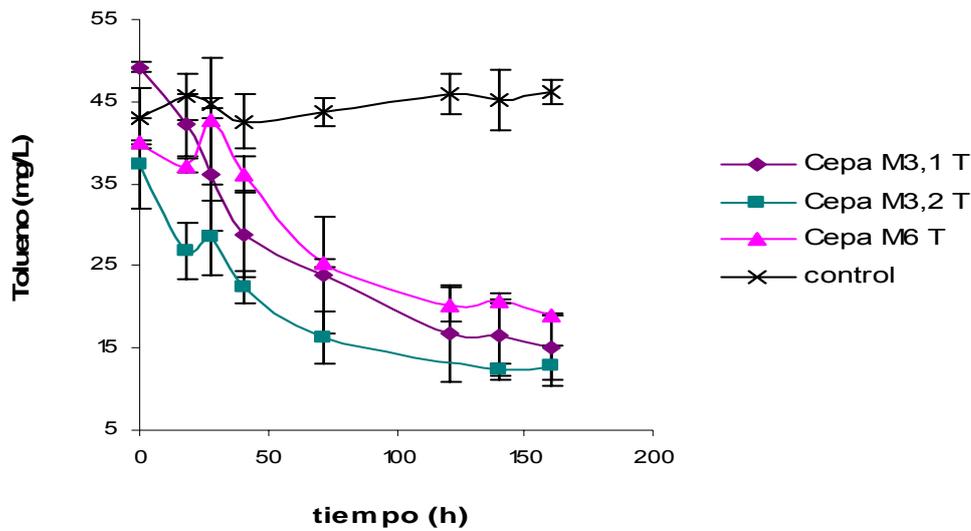


Figura 11. Degradación de Tolueno con las cepas: M 3,1 T, M 3,2 T y M 6 T

Los ensayos de degradación con las tres cepas aisladas capaces de crecer en tolueno mostraron un comportamiento similar, en donde la mayor cantidad de tolueno removido se observa en las 72 horas para las tres cepas (figura 11). Sin embargo la cepa que mostró mayor capacidad de remoción fue la M 3,1 T con 69.2% de tolueno removido, le siguió la cepas M 3,2 T con 65.8% de remoción y por último la cepa M 6 T con un 52.7 % de remoción, Las dos primeras cepas pertenecen a el género de *Aeromonas* y la ultima al género *Vibrio*.

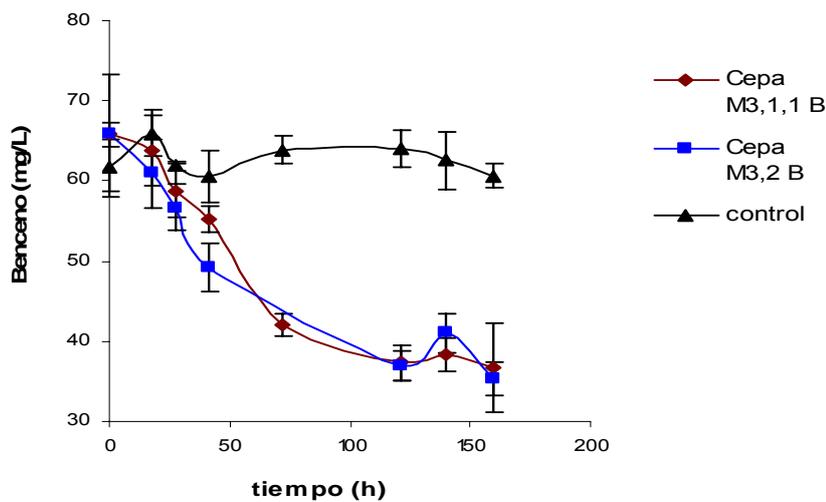


Figura 12. Degradación de Benceno con las cepas: M 3,1,1 B y M 3,2 B

Los ensayos de degradación con las dos cepas aisladas capaces de crecer en benceno mostraron tendencias similares, la mayor cantidad de benceno degradado se observa a las 110 horas (figura 12), la cepa que mostró mayor capacidad de remoción de benceno fue la cepa M 3,2 B con un 46.4% y después la cepa M 3,1,1 B con un 44.3% de remoción. El género para las primeras cepas es *Pseudomonas* y para la segunda *Aeromonas*.

En varios puntos de las graficas se observan desviaciones entandar relativamente grandes, como ya se mencionó los experimentos se realizaron por triplicado, en dichos experimentos no se puede asegurar al 100% la igualdad de estos, ya que pueden intervenir factores como: errores de metrología en las tomas de muestra y otro factor talvez el mas importante es que aun cuando se trate da la misma cepa en los tres experimentos estas pueden tener variaciones con respecto a la velocidad de degradación del sustrato comportándose de manera similar no de forma igual al 100%.

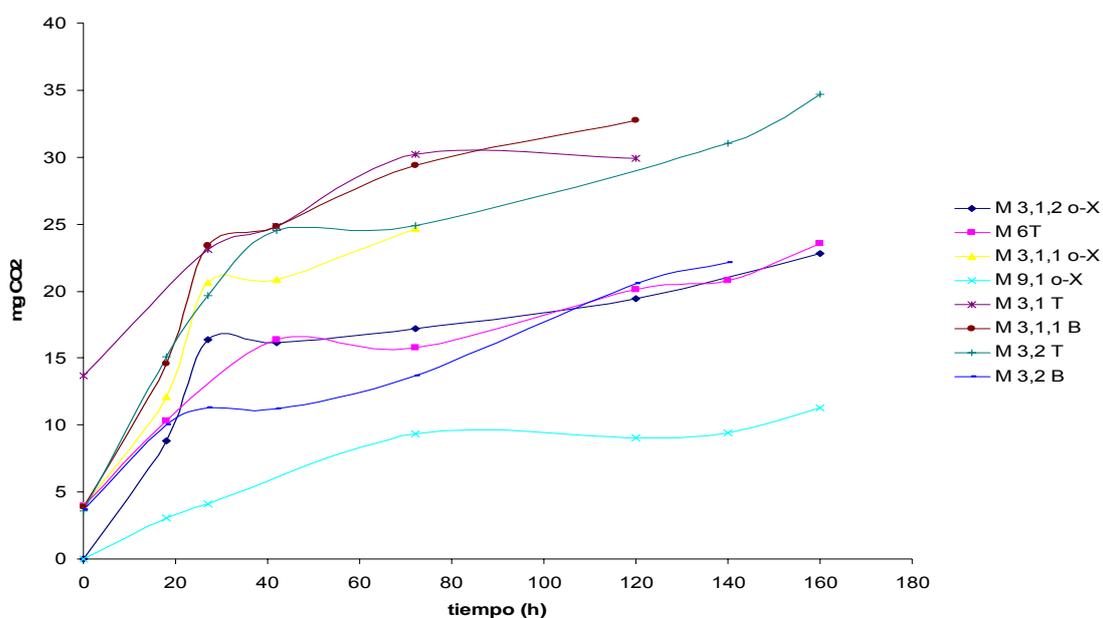


Figura 13. Producción de CO₂ durante las cinéticas de degradación de los compuestos BTX.

La producción de CO₂ para los compuestos BTEX (figura 13). Dicha producción de CO₂ está relacionada con dos principales procesos: por el metabolismo degradativo de los compuestos BTX's hasta CO₂ que lleva acabo el microorganismo, o por la descomposición de la materia orgánica perteneciente a los microorganismos involucrados en la degradación. Debido que no se tienen datos suficientes (testigos de respiración endógena para cada cepa) no se pueden realizar balances de materia que nos proporcionen

datos específicos de la cantidad de CO₂ que proviene de la degradación de sustrato.

Sin embargo se calcularon los porcentajes teóricos de carbono que proviene del sustrato y que fueron convertidos a CO₂ por el metabolismo de las cepas (cálculos en la sección 12).

Los valores obtenidos en la tabla 17 y 20, indican un valor teórico del porcentaje de carbono perteneciente al sustrato que fue convertido hasta CO₂ (mineralización completa del sustrato), haciendo la consideración de despreciar la respiración endógena. Esto nos sirve para saber cual es la posible proporción de carbono que perteneció al sustrato y se convirtió al CO₂ que fue medido al final de las cinéticas para cada cepa.

Tabla 17. Porcentaje de sustrato mineralizado (despreciando respiración endógena)

Cepa	% teórico de carbono del sustrato que paso a CO ₂
M 3,1,2 O-X	34.93
M 3,1,1 O-X	18.23
M9,1 O-X	17.82
M 3,1 T	43.07
M 3,2 T	65.01
M 6 T	41.3
M 3,1,1 B	28.36
M 3,2 B	20.29

Los porcentajes teóricos del carbono del sustrato que paso a CO₂, indican que solo una parte del sustrato esta siendo mineralizado por completo, y que la otra parte del CO₂ producido probablemente provenga de la respiración endógena del de la cepa.

Las cepa que mostro la mayor mineralización de sustrato fue la: M 3,2 T con un 65.01% esto quiere decir que de los 34.66 mg de CO₂ producido al final de la cinética (figura 13) solo 22.53 mg de CO₂ proviene de la mineralización del sustrato.

De acuerdo a lo anterior se obtiene la tabla 18.

Tabla 18. mg de CO₂ formados a partir de la mineralización del sustrato

cepa	mg de CO ₂ provenientes de la mineralización de sustrato	mg de CO ₂ totales obtenidos al final de la cinética
M 3,1,2 O-X	7,96	22,8
M 3,1,1 O-X	4,48	24,6
M9,1 O-X	2,01	17,82
M 3,1 T	12,8	29,9
M 3,2 T	22,49	34,6
M 6 T	9,73	23,5
M 3,1,1 B	9,82	34,66
M 3,2 B	4,49	22,14

Como se puede observa en la mayoría de las cepas la mayor cantidad de CO₂ no proviene de la mineralización del sustrato, lo que puede estar indicando varias cosas: posiblemente haya acumulación de intermediarios o que el CO₂ producido proviene de la respiración endógena de la cepa o que la mayor cantidad de carbono del sustrato este siendo ocupada para el crecimiento de la cepa etc.

Tabla 19. Parámetros cinéticos obtenidos de la degradación de compuestos BTX

cepa	Tasas de degradación (mg/h*mg _{proteína})	% de remoción
M3,1,2 o-X	5.5X10 ⁻⁴	87,96
M3,1,1 o-X	4.0X10 ⁻⁴	75,1
M9,1 o-X	3.0X10 ⁻⁴	58,9
M3,1 T	3.5X10 ⁻⁴	69,2
M3,2 T	3.0X10 ⁻⁴	65,8
M6 T	2.5X10 ⁻⁴	52,7
M3,1,1 B	2.0X10 ⁻⁴	44,3
M 3,2 B	1.5X10 ⁻⁴	46,4

La degradación de compuestos BTX siguen una cinética de primer orden, los datos obtenidos en las cinéticas se ajustaron al modelo de matemático $St=So \exp(-K*t)$ utilizado por K.Acuña-Askar en el 2004, este se describe en la sección 12.

Las tasas de degradación obtenidas en este estudio (tabla 19) tiene un valor promedio de los tres BTX's de 3.13×10^{-4} (mg/h*mg_{proteína}) a las obtenidas en los estudios de Ç. Barbaarslan et al. 2003 tiene un promedio general de 7.47×10^{-5} (mg/h*mg_{proteína}) y A. Acuña Askar et al., en los tres estudios tiene un promedio de 7.01×10^{-5} (mg/h*mg_{proteína}) con respecto a Laleh Yerushailmi et al., obtuvo tasas de 2.25×10^{-3} (mg/h*mg_{proteína}) y a A. Rozkov et al., reportó valores de 8.22×10^{-3} (mg/h*mg_{proteína}). Como se puede apreciar se obtuvieron mejores tasas de degradación con respecto a los dos primeros autores y más bajas con respecto a los dos ultimo autores. Se debe tomar en cuenta que en los estudios con los cuales se esta comparando los resultados obtenidos, se utilizan consorcios microbianos y en algunos casos como el de Laleh Yerushailmi se utilizan bacterias y hongos para realizar la degradación de BTEX.

Los % de remoción que se obtuvieron muestran en general valores menores en promedio de 63.7 % contra los reportados en la bibliografía que tiene un promedio entre todos los autores de 77.27%, En particular para o-Xileno donde se obtuvieron valores mayores de remoción entre 58.9% y 87.96% para este estudio, contra los obtenidos por Ç. Barbaarslan et al., y en el de A. Acuña Askar et al., 2006 reportaron valores entre 18.7% y 45% para este compuesto.

Una de las posibles razones por la cual se obtuvieron % de remoción menores que en la bibliografía, es la cantidad de inóculo inicial en los bioensayos, por ejemplo para A. Acuña Askar utilizó concentraciones de 880 a 905 mg/L de biomasa inicial, para Laleh Yerushailmi y A. Rozkov se utilizaron 100 mg/L de biomasa inicial, y para Ç. Barbaarslan se utilizó 2340 mg/L de biomasa inicial. Como se puede notar existe una diferencia bastante marcada, en comparación a los 20 mg/L de biomasa inicial que se ocuparon es este estudio, por lo que si se aumenta la concentración de biomasa inicial probablemente los % de remoción aumenten.

Cabe resaltar que las cepas que mostraron mejor capacidad de remoción en cada uno de los sustratos, también tiene las tasas de degradación mas altas, con esta concordancia de resultados, podemos proponer que si se aumenta la concertación de biomasa inicial se podrían obtener eficiencias de remoción mas altas en particular con estas cepas.

8.3.2 Cinéticas de degradación de compuestos MTBE y TBA

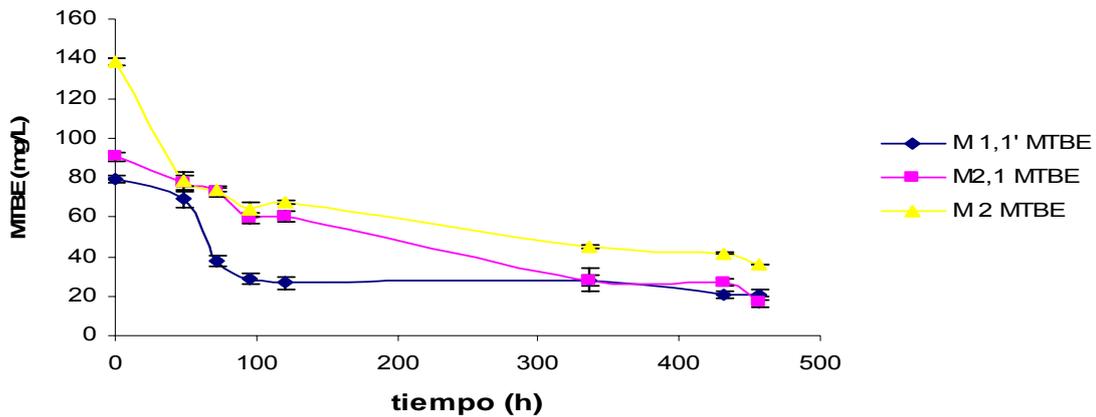


Figura 14. Degradación de MTBE con las cepas M 1,1' MTBE, M 2,1 MTBE y M 2 MTBE.

La degradación de MTBE de acuerdo a la figura 14. Muestra dos diferentes comportamientos. El primero esta representado por las cepas M2, 1 MTBE y M2 MTBE que pertenecen al género *Vibrio*, en donde la mayor cantidad de MTBE es degradado en aproximadamente 250 horas. El segundo comportamiento esta representado por la cepa M 1,1' MTBE que pertenece al género *Aeromona*, donde la mayor cantidad de MTBE degradado se observa aproximadamente a las 120 horas. La cepa con la que se obtuvo una mayor degradación fue la M 2,1 MTBE con un 81.19% de remoción, después le siguieron las cepas M 2 MTBE con 74.05% de remoción y por último la cepa M 1,1' MTBE con 73.95 % de remoción.

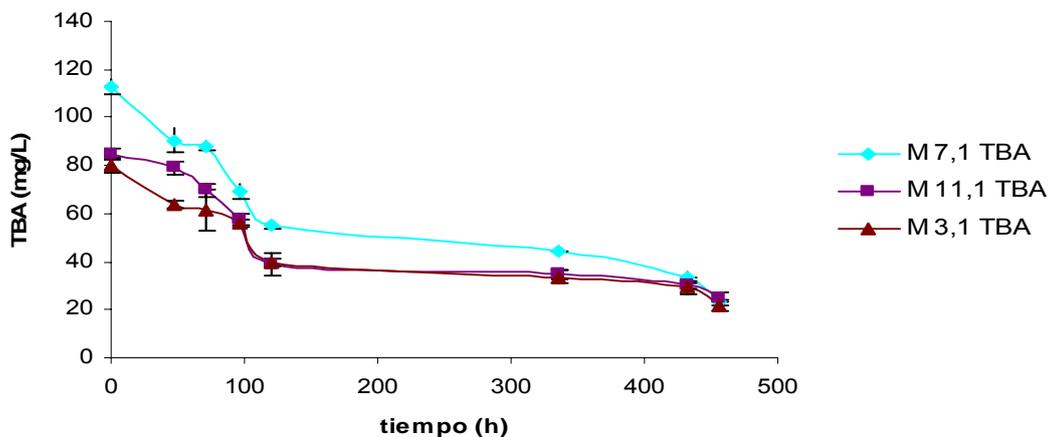


Figura 15. Degradación de TBA con las cepas M 7,1 TBA, M 11, 1 TBA y M 3,1 TBA

Para la degradación de TBA se observa en la figura 15 un comportamiento similar en la degradación de TBA para las tres sometidas a este proceso, la mayor cantidad de TBA degradado se observa aproximadamente a las 150 h para las tres cepas. En donde la cepa con mayor capacidad de degradación fue la M 7,1 TBA con 79.56 % de remoción, le sigue la cepa M 3,1 TBA con 72.88% de remoción y por último la cepa M 11,1 TBA con 70.19% de remoción. El género para la primera cepa es *Burkholderia* y siguientes pertenecen al género *Pseudomonas*

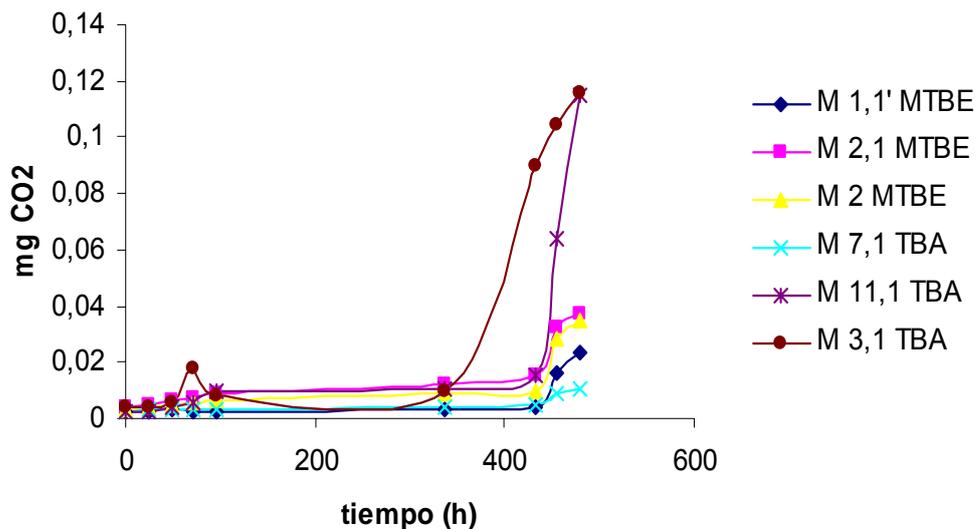


Figura 16. Producción de CO₂ durante las cinéticas de degradación de los compuestos MTBE y TBA.

De acuerdo a la figura 16 se observa una baja producción de CO₂ hasta antes de las 250 horas, lo cual no concuerda con las cinéticas de degradación ya que en las figuras 14 y 15 se observa la mayor cantidad de sustrato degradado aproximadamente a las 200 h y se esperaría que en este tiempo se observara la mayor cantidad de CO₂ producido. Por esta razón se puede pensar que el aumento de la concertación de CO₂ después de las 300 horas ya no proviene de la degradación de sustrato, si no de la biomasa que ya empieza a morir y por lo tanto se produce CO₂.

Para conocer el % de carbono del sustrato que se convirtió en CO₂ se realiza una estimación teórica, utilizando las mismas consideraciones que se tomaron para los datos de BTX's

Tabla 20. Cantidad de carbono del sustrato que paso a formar parte del CO₂ medido al final del a cinética para MTBE

cepa	% teórico de carbono del sustrato que paso a CO ₂
M 1,1' MTBE	0,024
M 2,1 MTBE	0,033
M 2 MTBE	0,02
M 7,1 TBA	0,0099
M 11,1 TBA	0,141
M 3,1 TBA	0,149

Tomando en cuenta los mismos criterios que para BTX's para evaluar la producción de CO₂ en las capas de MTBE y TBA tenemos lo siguiente:

Las cepa que mostro la mayor mineralización de sustrato fue la: M 3,1 TBA con un 0.149% esto quiere decir que de los 0.115 mg de CO₂ producido al final de la cinética (figura 16) solo 1.71×10^{-4} mg de CO₂ proviene de la mineralización del sustrato y probablemente los 0.114 mg de CO₂ sobrantes proviene de la muerte celular.

Para el caso de MTBE y TBA con respecto al CO₂ que proviene de la mineralización del sustrato no es necesario un análisis completo de todas las cepas ya que como lo pudimos comprobar en la figura 16 y con el resultado de la cepa M 3,1 TBA con respecto al CO₂ es suficiente evidencia que la cantidad de CO₂ formado no proviene de la mineralización del sustrato, si no de la muerte celular al final de la cinética.

Tabla 21. Tasas de degradación de MTBE y TBA y % de remoción de dichos compuestos

cepa	Tasas de degradación (mg/h*mg _{proteína})	% de remoción
M 1,1' MTBE	0.00345	73.95
M 2,1 MTBE	0.0005	81.19
M 2 MTBE	0.0005	74.05
M 7,1 TBA	0.0009	79.56
M 11,1 TBA	0.00165	70.19
M 3,1 TBA	0.00085	72.88

Las cinéticas de MTBE y TBA, no siguen las tendencias de primer orden, por lo cual se utilizó un modelo no lineal que tiene por nombre Gompertz el cual se describe en la sección 11

Al comparar las tasas de degradación de MTBE, que se obtuvieron de acuerdo a la tabla 21, contra las obtenidas en la tabla 7 se observa que las tasas de degradación son más pequeñas en lo general, comparando ahora con las obtenidas de la tabla 8 se observa que se supera la tasa de degradación del consorcio obtenido por Hardison et al., 1997 con las tres cepas de este estudio, con respecto a los demás autores se también se obtuvieron valores más pequeños.

Uno de los estudios más importantes que se han realizado en México para la degradación de MTBE son los estudios de A. Acuña Askar. Al comparar las tasas de degradación y % de remoción obtenidas en dicho estudio (tabla 8) contra las obtenidas en este estudio (tabla 21) se puede observar que las tres tasas de degradación son más grandes, y los % de remoción son mucho mayores, aún cuando la diferencia de biomasa inicial ocupada es bastante grande, para A. Acuña Askar de 880 a 905 mg/L y en este estudio es de 20 mg /L. Para TBA se obtuvieron tasas de degradación más bajas con respecto a la literatura (tabla 8).

9. Conclusiones

Se comprobó que existen microorganismos en los sedimentos orgánicos que provienen de los sistemas de transporte de gasolina analizados. Se aislaron diferentes bacterias aerobias a partir de sedimentos de sistemas de transporte de gasolina, que mostraron capacidad para utilizar como única fuente de carbono y energía Benceno, Tolueno, o-Xileno, MTBE o TBA.

Se identificaron los géneros: *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Vibrio* y *Burkholderia*.

Algunos de los géneros identificados *Vibrio*, *Burkholderia* y *Pseudomonas* se han encontrado en sitios contaminados con gasolina, y se han utilizado en estudios de biorremediación.

El género *Aeromonas* se encontró en 5 de los ocho cultivos que degradan BTX's, lo cual es un género con capacidad de metabólica adaptable a cualquiera de los compuestos BTX.

Los porcentajes de remoción de BTX's, MTBE y TBA obtenidos demuestran que las cepas aisladas son capaces de utilizar a estos compuestos como única fuente de carbono y energía.

Las tasas de degradación de BTX's son en promedio mayores a las reportadas con cultivos mixtos, con lo cual se puede esperar que los tiempos de adaptación son menores o nulos con respecto a los reportados en la literatura.

En el caso de las cinéticas de MTBE no se detectó la acumulación de principal intermediario el TBA. Lo cual sugiere que el sustrato es degradado a otro intermediario como el diol o el HIBA ya que no se pudo relacionar directamente la mineralización del sustrato con la producción de CO₂

Para las tasas de degradación de MTBE se observó en general que son menores a las reportadas en la literatura, pero una ventaja de las cepas obtenidas es que puede utilizar al MTBE como única fuente de carbono y energía eliminando la estrategia cometabólica.

Con respecto al TBA también se obtuvieron tasas de degradación menores que la bibliografía, pero también la ventaja de las cepas obtenidas es que pueden utilizar al TBA como única fuente de carbono y energía eliminando la estrategia cometabólica.

La mayor cantidad de CO₂ formado en las cinéticas de los compuestos BTX proviene de procesos diferentes a la mineralización de sustrato, como por ejemplo respiración endógena, crecimiento celular muerte celular etc.

10. Recomendaciones

Para una identificación mas precisa de las bacterias involucradas en la degradación de compuestos BTEX MTBE o TBA se recomienda una secuenciación del ADN en la región 16S del genoma bacteriano o en su defecto una secuenciación completa del genoma bacteriano.

Realizar un control para medir respiración endógena y así poder realizar los balances de materia y calcular los gramos o moles de CO₂ que provienen del sustrato.

Se recomendaría para el caso de las cinéticas de MTBE y TBA medir acumulación de intermediarios como el: diol e HIBA para proporcionar información si el metabolismo se esta llevando acabo con acumulación de intermediarios.

Se recomendaría realizar consorcios microbianos entre cepas que degradan el mismo compuesto para determinar si se pueden mejorar las tasas de degradación y % de remoción de dichos compuestos. O también para usarlas en estudios de biorremediación de mezclas o sistemas cercanos a los reales.

También se recomienda realizar consorcios entre cepas que crecen en diferente compuesto, adicionando mezclas de compuestos de donde provienen las cepas, para determinar la capacidad de remoción de la mezcla de compuestos.

Pensando en una aplicación de remoción de compuestos BTEX a mayor escala se recomendaría estudiar la posibilidad de implementar un biorreactor con células inmovilizadas ya que esto podría dar más estabilidad a la biomasa y alargar su tiempo de vida.

11.Anexos

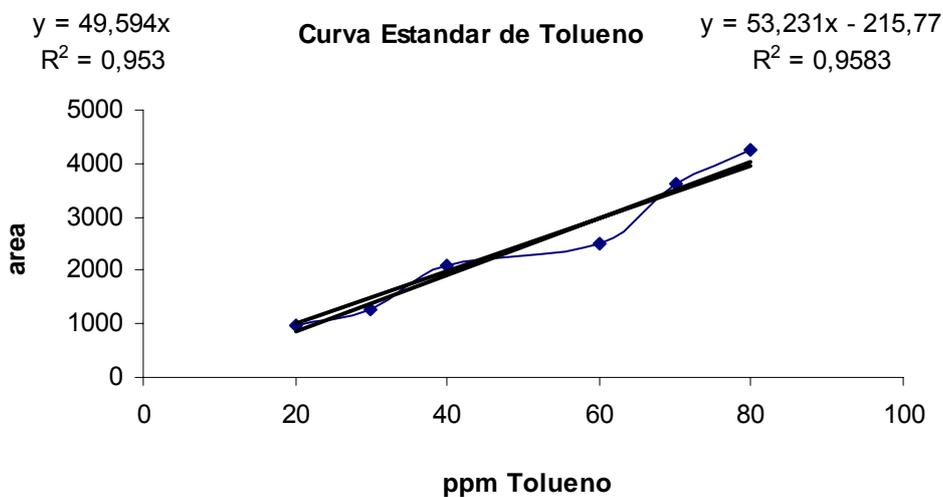
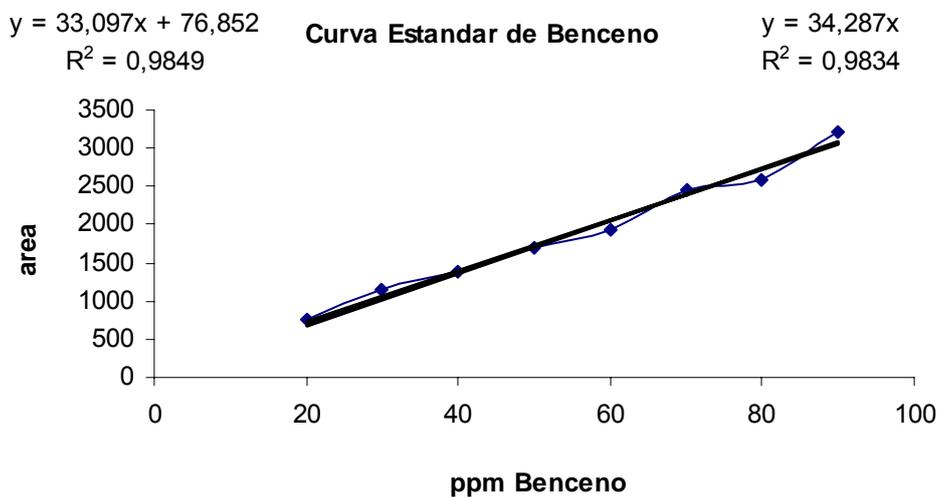
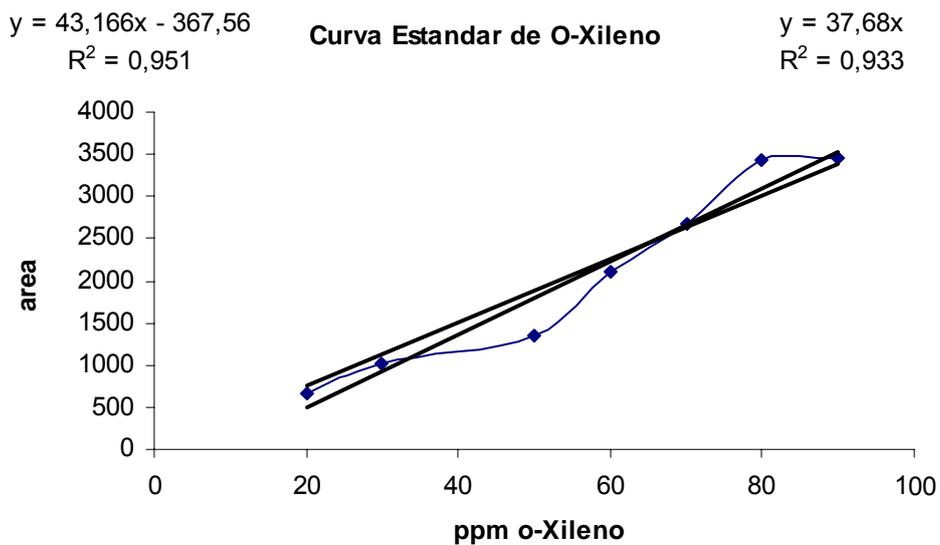
Ejemplo simplificado de resultados obtenidos en la identificación Bioquímica

REFERENCE	M3,1 O-X 24 h ox +				8/23/07	COMMENT	
Strip	Profile	Identification comment	Taxón	% ID	T index	Type	Note
API 20 NE V7.0	----- +--+ ++- +++	VERY GOOD IDENTIFICATION	Pseudomonas stutzeri	99,5	0,68	Significant	ID. NOT VALID BEFORE 48 HOURS
API 20 NE V7.0	----- +--+ ++- +++	VERY GOOD IDENTIFICATION	Ochrobactrum anthropi	0,3	0,44	Next	ID. NOT VALID BEFORE 48 HOURS

Ejemplo de tratamiento de datos para las cinéticas de BTX

Cepa M3,1,2 O-X (1,2)					
tiempo (h)	Área promedio	[S] mg/L	Desviación estándar	(So-S)/dt en (mg/L)	ln [S]
0	1960,15	52,020966	4,35185941	0	3,95164683
18	854,75	22,684448	3,07951759	29,336518	3,12167958
28	762,5	20,2361996	4,67275978	31,7847665	3,00747306
41	551,1	14,6257962	4,53764383	37,3951699	2,68278683
72	383,5	10,1778132	2,36265244	41,8431529	2,32021017
121	312,5	8,29352442	1,8315717	43,7274416	2,11547502
160	235,91	6,2608811	1,00961637	45,7600849	1,83432093
			% de remoción =	87,9646966	

Curvas estándar de BTX.



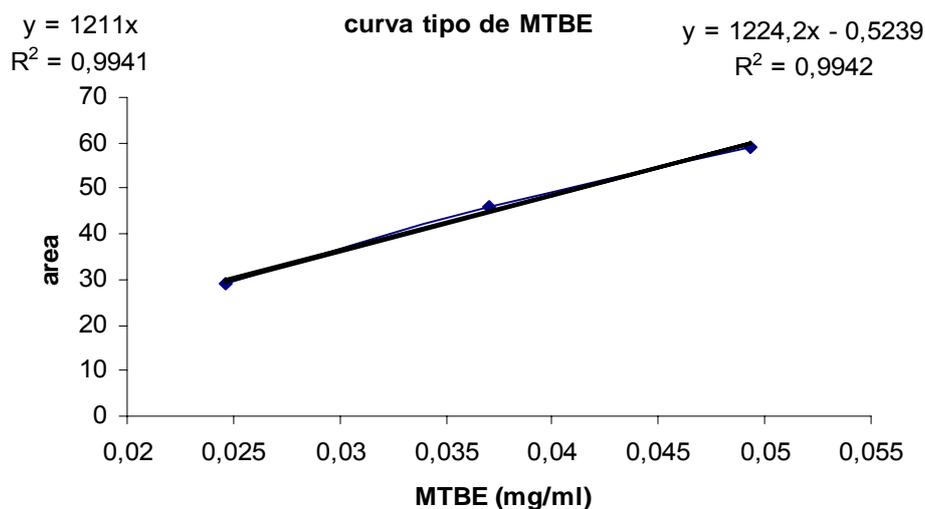
Ejemplo de tratamientos datos para obtener los mg de CO₂ en las muestras de BTX

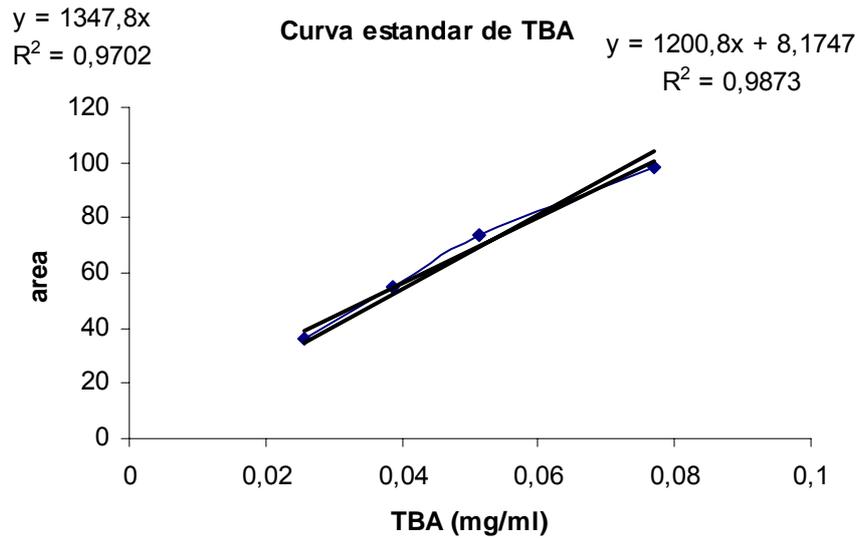
M3,2 T					
tiempo	1°% de CO ₂	2°% de CO ₂	Promedio de los %	moles CO ₂	(mg) CO ₂
0	86,342	91,049	88,6955	0,00027489	12,0950692
18	371,233	376,265	373,749	0,00115833	50,9667348
27	485,124	487,082	486,103	0,00150655	66,2880241
42	609,52	605,267	607,3935	0,00188245	82,8279499
72	616,162	616,623	616,3925	0,00191034	84,0551095
140	769,774	765,7845	767,77925	0,00237953	104,699147
160	861,56	855,561	858,5605	0,00266088	117,078642

Ejemplo tratamiento de datos para cinéticas de MTBE y TBA

Cepa M 1,1 ' MTBE						
tiempo	área	[S]=mg/ml	[S]=mg/L=ppm	(So-S)/dt en (mg/mL)	(So-S)/dt en (mg/L)	desv estandar
0	96,025	0,07929397	79,29397192	0	0	1,66170094
48	83,395	0,06886457	68,86457473	0,0104294	10,4293972	4,47598592
72	45,61	0,03766309	37,66308836	0,04163088	41,6308836	2,84256926
96	35,05	0,02894302	28,9430223	0,05035095	50,3509496	2,75771645
120	32,15	0,02654831	26,54830718	0,05274566	52,7456647	3,04055916
336	33,6	0,02774566	27,74566474	0,05154831	51,5483072	2,40416306
432	25,25	0,02085054	20,85053675	0,05844344	58,4434352	2,05060967
456	25,005	0,02064822	20,64822461	0,05864575	58,6457473	2,94863528
		% remoción=	73,95990627			

Curvas estándar de MTBE y TBA





Ejemplo de tratamientos datos para obtener los mg de CO₂ en las muestras de MTBE y TBA

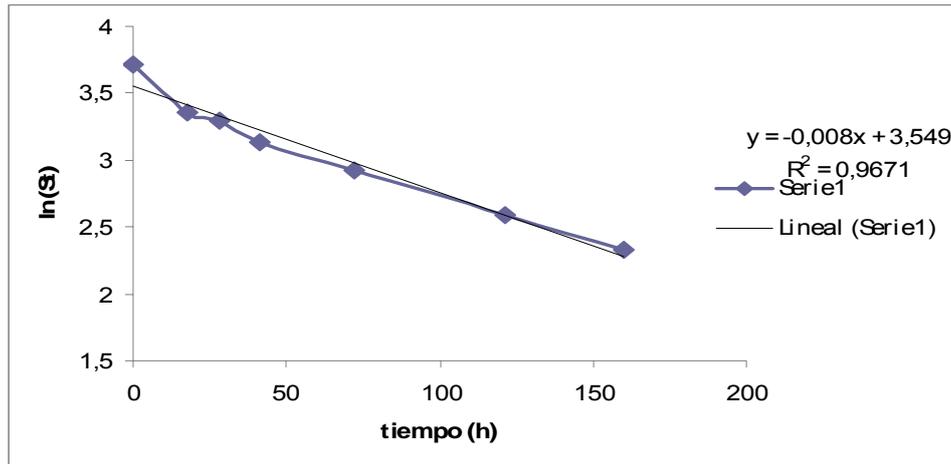
M 11, 1 TBA						
tiempo	1° % de CO ₂	2° % de CO ₂	Promedio % de CO ₂	moles CO ₂	(mg) CO ₂	
0	0,054	0,049	0,0515	1,6E-07	0,00702	
24	0,059	0,053	0,056	1,7E-07	0,00764	
48	0,102	0,103	0,1025	3,2E-07	0,01398	
72	0,124	0,149	0,1365	4,2E-07	0,01861	
96	0,22	0,26	0,24	7,4E-07	0,03273	
336	0,262	0,271	0,2665	8,3E-07	0,03634	
432	0,38	0,369	0,3745	1,2E-06	0,05107	
456	1,589	1,56	1,5745	4,9E-06	0,21471	
480	2,872	2,83	2,851	8,8E-06	0,38878	

Modelo matemático $St=So \exp (-K*t)$ $\ln St = \ln So -K*t$ aplicado en las cinéticas de degradación de BTX descrito por K. Acuña-Askar

- St= concentración de substrato al tiempo t (mg/mL)
- So= concentración de substrato al tiempo cero (mg/mL)
- K = constante general de primer orden (h⁻¹)
- X= concertación inicial de biomasa (mg/mL)
- k= constante tasa de degradación mg/mg_{proteína} *h
- t= tiempo (h⁻¹)

Se grafica $\ln(S)$ vs $\ln(S_0)$ para obtener la pendiente k ,

Cepa M3,1,1 O-X (1,2)						
tiempo (h)	área	{ } (ppm)	Des	consu mg/L	$\ln[S]$	
0	1545,45	41,0151274	4,04784853	0	3,71394096	
18	1085,25	28,8017516	2,44897651	12,2133758	3,3604362	
28	1010,15	26,8086518	2,78301315	14,2064756	3,28872466	
41	861,8	22,8715499	2,05676495	18,1435775	3,12989378	
72	701,7	18,6226115	2,06051817	22,3925159	2,92437651	
121	459,25	13,382431	1,46563269	27,6326964	2,59394273	
160	385,29	10,2254512	0,67726868	30,7896762	2,32487982	



Programa para la obtención parámetros cinéticos para MTBE y TBA con el método de Gompertz ejemplo

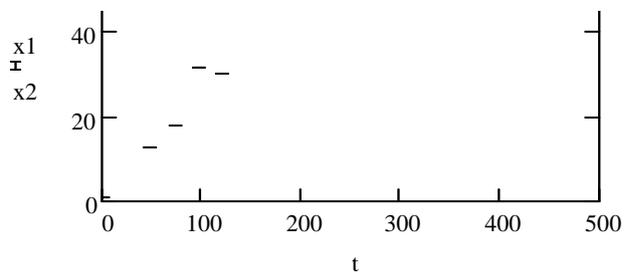
$$S_c := \alpha \exp(\beta e^{-\gamma t})$$

- $S_c = (S_0 - S)$ Concertación de sustrato inicial menos la final
- $\alpha = (g_{\text{sustrato}}/L)$ máxima concentración de sustrato consumido cuando t tiende al infinito (este termino es igual a la concentración inicial de sustrato añadido)
- $\beta =$ parámetro relacionado con las condiciones iniciales cuando ($t=0$ entonces $S = S_0 = \alpha \exp(-\beta)$)
- $\gamma =$ tasa específica de degradación (h^{-1})
- $t =$ tiempo (h)

X_1, x_2 y $x_3 =$ concentraciones de sustrato

$$\begin{array}{l}
 t := \begin{pmatrix} 1 \\ 48 \\ 72 \\ 96 \\ 120 \\ 336 \\ 432 \\ 456 \end{pmatrix} \\
 x1 := \begin{pmatrix} 1 \\ 12.675 \\ 17.679 \\ 31.379 \\ 30.231 \\ 62.18 \\ 63.654 \\ 73.381 \end{pmatrix} \\
 x2 := \begin{pmatrix} 1 \\ 12.674 \\ 17.678 \\ 31.378 \\ 30.233 \\ 62.181 \\ 63.653 \\ 73.382 \end{pmatrix} \\
 x3 := \begin{pmatrix} 1 \\ 12.673 \\ 17.677 \\ 31.375 \\ 30.231 \\ 62.182 \\ 63.652 \\ 73.383 \end{pmatrix}
 \end{array}$$

Tiempo (h)	sutrato $\frac{(S_0 - S)}{dt}$ $\left(\frac{mg}{L}\right)$
0	0
48	12,6754748
72	17,6796036
96	31,3790256
120	30,2312139
336	62,1800165
432	63,654005
456	73,3815029



$$i := 0..7 \quad X_i := \frac{x1_i + x2_i + x3_i}{3} \quad n := \text{length}(X) - 1$$

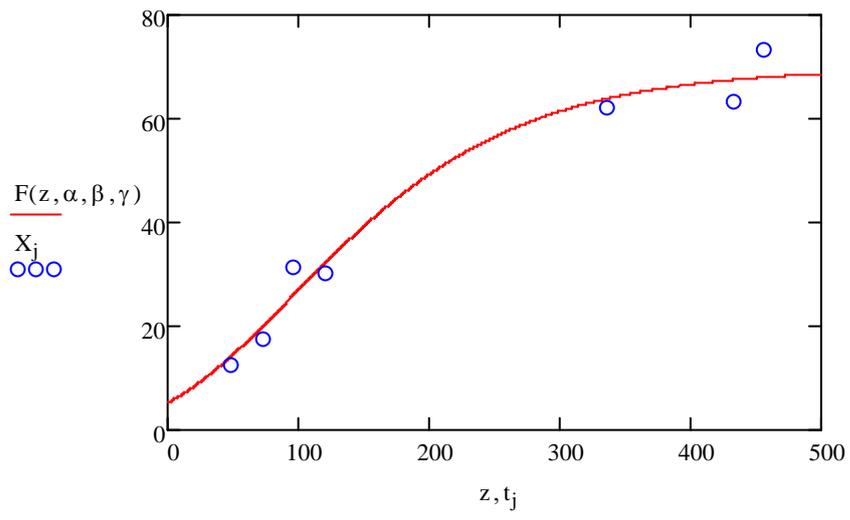
$$F(t, \alpha, \beta, \gamma) := \alpha \cdot e^{\beta \cdot e^{\gamma \cdot t}} \quad j := 1..n \quad SSE(\alpha, \beta, \gamma) := \sum_j (X_j - F(t_j, \alpha, \beta, \gamma))^2$$

$$\alpha := 4 \quad \beta := -2 \quad \gamma := -.005 \quad 1 = 1 \quad 2 = 2$$

Dado $SSE(\alpha, \beta, \gamma) = 0$

$$\begin{pmatrix} \alpha \\ \beta \\ \gamma \end{pmatrix} := \text{Minerr}(\alpha, \beta, \gamma)$$

$$z := 0, 0.1.. 500$$



$$\alpha = 69.841$$

$$\beta = -2.59$$

$$\gamma = 0.01 \text{ h}^{-1}$$

Método de obtención de los % teóricos de carbono que proviene del sustrato y se transforma en CO2

Cálculo de moles de de carbono del sustrato que se convierten en CO2

$$X := 4 \quad Y := 10 \quad Z := 2$$

Peso molecular de sustrato Sustrato inicial

$$\overset{\text{C}}{\text{MW}} := 12 \cdot X \quad \text{So} := 80.16 \quad \text{mg}$$

$$\overset{\text{H}}{\text{MW}} := 1 \cdot Y$$

$$O := 16 \cdot Z$$

$$\text{PMsustr} := (C + H + O) \cdot 1000$$

Moles de sustrato inicial

$$\text{PMsustr} = 9 \times 10^4 \quad \frac{\text{mg}}{\text{mol}} \quad \text{o} \quad \text{Moles}$$

$$\text{MolS} := \frac{\text{So}}{\text{PMsustr}}$$

$$\text{MolS} = 8.907 \times 10^{-4} \quad \text{Moles}$$

La cantidad de carbono en moles que hay en una cierta cantidad de sustrato inicial esta dado por (XC) que es igual a:

$$\text{XC} := \frac{\text{MolS} \cdot (C \cdot 1000)}{\text{PMsustr}} \quad \frac{\text{moles} \cdot \text{moles}}{\text{moles}} := \text{moles}$$

$$\text{XC} = 4.75 \times 10^{-4} \quad \text{Moles de carbono en sustrato inicial}$$

Peso molecular de CO2

$$C2 := 12$$

$$O2 := 32$$

$$\text{PMco2} := (C2 + O2) \cdot 1000$$

Moles de CO2 medido al final de la cinética

$$\text{PMco2} = 4.4 \times 10^4 \quad \frac{\text{mg}}{\text{mol}} \quad \text{o} \quad \text{Moles}$$

$$\text{CO2pra} := 2.6 \cdot 10^{-6}$$

La cantidad de carbono en moles que hay en una cierta cantidad de CO2 que se midió al final de la cinética esta dado por (XCO2) que es igual a

$$\text{XCO2} := \frac{\text{CO2pra} \cdot (C2 \cdot 1000)}{\text{PMco2}} \quad \frac{\text{moles} \cdot \text{moles}}{\text{moles}} := \text{moles}$$

$$\text{XCO2} = 7.091 \times 10^{-7} \quad \text{Moles de carbono en CO2 medido al final de la cinética}$$

Considerando que todo el carbono del sustrato inicial pasa a formar parte del CO2 debido a una mineralización completa. Se puede obtener un porcentaje del carbono proveniente de del sustrato inicial que se incorpora a CO2 con lo siguiente:

$$\%C := \frac{\text{XCO2} \cdot 100}{\text{XC}}$$

$$\%C = 0.149$$

12- Bibliografía

- 1) A. Pruden, M. Sedran, M. Suidan and A. Venosa Biodegradation of MTBE and BTEX in an aerobic fluidized bed reactor Water Science and Technology Vol 47 No 9 pp 123–128 2003
- 2) A. Rozkov;_, A. Käär & R. Vilu Biodegradation of dissolved jet fuel in chemostat by a mixed bacterial culture isolated from a heavily polluted site 1998
- 3) Buenrostro C. y Dovali, A. 2001. Estudio para la Determinación y Evaluación del Metil tert-Butil Ether (MTBE). Oficio GDF-SOS/01-523
- 4) Environmental Protection Agency 2007 Last updated on Tuesday, December 18th, 2007 http://209.85.171.104/translate_c?hl=es&sl=en&u=http://www.epa.gov/region09/waste/features/tesoro/index.html&prev=/search%3Fq%3DMTBE%2Bepa%2B2007%26hl%3Des
- 5) Federal Register Environmental Protection Agency 40 CFR Part 755 Methyl Tertiary Butyl Ether (MTBE); Advance Notice of To Initiate Rulemaking Under the Toxic Substances Control Act To Eliminate or Limit the Use of MTBE *Friday March 24, 2000*
- 6) Fiorenza, S. and Hanadi S. Rifai. 2003. Review of MTBE Biodegradation and Bioremediation. *Bioremediation Journal*. 7(1): 1-35.
- 7) Garfias y Gutiérrez, Gasolinas Oxigenadas. La Experiencia Mexicana “estudio de contaminación de suelos y aguas por MTBE en E.U.A.”2003 ,FCE, IMP, UNAM editores México DF
- 8) Hanson, J.R., Ackerman, C.E. and Scow, K.M.1999. Biodegradation of Methyl tert- Butyl Ether by a Pure Bacterial Culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(11): 4788-4792.
- 9) Jesper Steen Christensen and Jason Elton Soil and Groundwater pollution from BTEX Fall 1996Send comments or suggestions to: Student Authors: Jesper Steen Christensen June 7, 1998 <http://ewr.cee.vt.edu/environmental/teach/gwprimer/btex/btex.html>

- 10) Juan Manuel Lesser. EL MTBE y los Acuíferos Teorema Ambiental Todos los derechos reservados http://www.teorema.com.mx/articulos.php?id_sec=52&id_art=2206&id_ejemplar=80
- 11) K. Acuna-Askar, A. J. Englande, Jr., C. Hu and G. Jin Methyl tertiary-butyl ether (MTBE) biodegradation in batch and continuous upflow fixed-biofilm reactors *Water Science and Technology* Vol 42 Nos 5–6 pp 153–161
- 12) K. Acuna-Askar, A.J. Englande, Jr., A. Ramirez-Medrano, J.E. Coronado-Guardiola and B. Chavez-Gomez. Evaluation of biomass production in unleaded gasoline and BTEX-fed batch reactors *Water Science and Technology* Vol 48 No 8 pp 127–133 2003
- 13) K. Acuna-Askar, J.F. Villarreal-Chiu, M.V. Gracia-Lozano, M.T. Garza-Gonzalez B. Chavez-Gomez, I.P. Rodriguez-Sanchez and H.A. Barrera-Saldana *BTE-OX biodegradation kinetics with MTBE through bioaugmentation water Science and Technology* Vol 50 No 5 pp 85–92 2004
- 14) K. Acuna-Askar, M.V. Gracia-Lozano, J.F. Villarreal-Chiu, J.G. Marmolejo M.T. Garza-Gonzalez and B. Chavez-Gomez Effect of soil and a nonionic surfactant on BTE-oX and MTBE biodegradation kinetics *Water Science & Technology* Vol 52 No 8 pp 107–115 2005
- 15) K. Acuna-Askar, M.A. de la Torre-Torres*, M.J. Guerrero-Munoz, M.T. Garza-Gonzalez, B. Chavez-Gomez, I.P. Rodriguez-Sanchez* and H.A. Barrera-Saldana Biodegradation kinetics of BTE-OX and MTBE by a diesel-grown biomass *Water Science & Technology* Vol 53 No 11 pp 197–204 2006
- 16) Kazuya Watanabe,* Kanako Watanabe, Yumiko Kodama Kazuaki Syutsubo, And Shigeaki Harayama Molecular Characterization of Bacterial Populations in Petroleum-Contaminated Groundwater Discharged from Underground Crude Oil Storage Cavities Received 27 March 2000/Accepted 24 July 2000

- 17) Laleh Yerushalmi, Michelle F. Manuel & Serge R. Guiot Biodegradation of gasoline and BTEX in a microaerophilic biobarrier 1999
- 18) Maria Elena Acuña, Fermin Pérez, Richard Auria, Sergio Revah Microbiological and Kinetic Aspects of a Biofilter for the Removal of Toluene from Waste Gases Received 13 April 1998; accepted 13 October 1998
- 19) Nava-Ramírez, V, (2007) Caracterización cinética de la degradación metabólica del Metil-tret-butil-éter por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y estudio de la variabilidad proteica asociada a los primeros pasos de la degradación catabólica.
- 20) Oscar Ortíz Brito, Irina Ize Lema, y Arturo Gavilán García. La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México Periférico 5000, Col. Insurgentes Cuicuilco, C.P. 04530, Delegación Coyoacán, México D.F. Última Actualización: 31/03/2005
<http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/gacetitas/422/restauracion.html>
- 21) PETRÓLEOS MEXICANOS (PEMEX) Marina Nacional #329, Col. Huasteca, C.P. 11311, México D.F. (+52 55) 1944 2500.
Informe de Autoevaluación 2006 y Anuario estadístico 2005 Mayo del 2007 <http://www.pemex.com>
- 22) P.J.J Alvarez and T.M. Vogel Degradation of BTEX and their aerobic metabolites by indigenous microorganisms under nitrate reducing conditions Wat. Sci. Tech vol 31 pp 15-28 1995
- 23) Procuraduría de Protección al Ambiente (PROFEPa) Edificio AJUSCO Carretera Picacho-Ajusco 200 Col. Jardines en la Montaña Deleg. Tlalpan, C.P. 14210, México D.F. tel. 54-49-63-00. tel. 01-800-77-033-72
<http://www.profepa.gob.mx/PROFEPa/InspeccionIndustrial/EmergenciasAmbientalesIndustria/InstructivosaplicablesaEmergenciasAmbientales/ReporteDeemergencias.htm>
- 24) Román Román, María Concepción Guía técnica de Atenuación Natural Monitorizada en emplazamientos contaminados. Técnicas de bioestimulación y bioaumentación para la potenciación de la biodegradación de contaminantes,, Universidad Politécnica de Cataluña abril-2005

- 25)Secretaria de Energía. Gasolina Insurgentes sur 890, Col. Del Valle. México, D.F. 03100. México Tel: 5000 6000 http://www.energia.gob.mx/wb2/Sener/Sene_166_gasolina
- 26)SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES NORMA Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-138-ECOL-2002, CASSIO LUISELLI FERNANDEZ, Subsecretario de Fomento y Normatividad Ambiental, y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización para la Protección Ambiental
- 27)Stefan, R.J., McClay, K., Vainberg, S., Condee, C.W. and Zhang, D. 1997. Biodegradation of the Gasoline Oxygenates Methyl tert-Butyl Ether, Ethil ter-Butyl Ether, and tert.Amyl Methyl Ether by Propane-Oxidizing Bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 63(11): 4216-4222
- 28)Xiang Y. Zhu,* John Lubeck, and John J. Kilbane II Characterization of Microbial Communities in Gas Industry Pipelines Environmental Science and Technology Center, Gas Technology Institute, 2003
- 29)Ç. BABAARSLAN T. ABUHAMED Ü. MEHMETOGL Biodegradation of BTEX Compounds by a Mixed Culture Obtained from Petroleum Formation Water Energy Sources, 25:733–742, 2003