



UNIDAD IZTAPALAPA.

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**Caracterización cinética y propagación de
consorcios microbianos capaces de eliminar
metil tert-butil éter (MTBE)**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

I.B.I. Angélica López Moreno.

**DIRECTOR:
DR. SERGIO REVAH MOISEEV.**

MÉXICO D.F. OCTUBRE 2005.

“El posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa está incluido en el patrón de posgrado de excelencia del CONACyT, además cuenta con el apoyo del mismo consejo con el convenio 471-O/maestría en Biotecnología.”

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación de resultados.

“Caracterización cinética y propagación de consorcios microbianos capaces de eliminar metil tert-butil éter (MTBE)”

Que presentó

Angélica López Moreno

En octubre del 2005.

Director: Dr. Sergio Revah Moiseev. _____

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Asesora: Dra. Marcia Morales Ibarría. _____

Instituto Mexicano del Petróleo.

Asesora: Dra. Elvia Inés García Peña. _____

Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI)-IPN

Sinodal: Dr. Francisco José Fernández Perrino. _____

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Sinodal: Dra. Flor de María Cuervo López. _____

Universidad Autónoma Metropolitana.

*Un agradecimiento especial para la Universidad Autónoma
Metropolitana Unidad Iztapalapa y al Consejo Nacional de Ciencia
y Tecnología.*

Dedicatorias y agradecimientos.

Le doy gracias a Dios por el logro permitido.

Inés por tu tiempo, paciencia y amistad, muchas gracias.

A Sergio Hernández muchas gracias por tu tiempo.

A Paco-pepe muchas gracias por tus enseñanzas.

Un agradecimiento al Dr. Sepúlveda por su ayuda con las microscopías.

Al Dr. Revah por permitirme ser parte de su grupo de trabajo.

A cada uno de mis compañeros y amigos, muchas gracias por escuchar cuando lo necesite y por cada palabra de aliento.

A mi madre por darme la vida y por todo tu apoyo.

Esta tesis se la dedico a los dos grandes amores de mi vida, a ti chaparro y Emma.

GRACIAS A TODOS.

Contenido	Páginas
Índice de figuras	IV
Índice de tablas	VI
Glosario	VIII
Resumen	1
Abstract	3
1. Introducción	5
1.1 Características fisicoquímicas del MTBE	5
1.2 Contaminación ambiental	6
1.3 Contaminación por MTBE	8
1.4 Toxicidad del MTBE	11
2. Métodos de eliminación del MTBE	13
2.1 Procesos fisicoquímicos.	13
2.2 Procesos biológicos	15
2.3 Reactores	24
2.4 Estudios en el campo	28
2.5 Degradación anaerobia de MTBE	30
3. Monitoreo de poblaciones basadas en técnicas de biología molecular	32
4. Justificación	36
5. Objetivos	37
5.1 Objetivo general	37
5.2 Objetivos particulares	37
6. Material y métodos	38
6.1 Estrategia Experimental.	38
6.2 Material biológico	40
6.3 Medio de cultivo	40
6.4 Sistemas experimentales	41
6.3.1 Reactores	41
6.3.2 Microcosmos	41
6.5 Cuantificación de proteína	42
6.4.1 Curva patrón de proteína	43

6.4.2	Peso seco	43
6.6	Métodos analíticos	43
6.5.1	Curvas patrón para MTBE y coeficiente de partición	44
6.7	Técnicas de microscopía electrónica	45
6.6.1	Secado al punto crítico	45
6.8	Técnicas moleculares	45
6.8.1	Extracción de ADN	45
6.8.2	Amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD)	46
6.8.3	Condiciones del RAPD	46
7.	Resultados y discusión.	48
7.1	Efecto de los S_{alt} en la etapa de adaptación para el consumo de MTBE	48
7.1.1	Primera adición de MTBE y S_{alt}	48
7.1.2	Segunda y tercera adición de MTBE	50
7.1.3	Rendimientos	53
7.1.4	Velocidades de consumo	54
7.2	Influencia de los S_{alt} en las velocidades de consumo de MTBE	56
7.2.1	Consortio F	56
7.2.1.1	Rendimientos	60
7.2.1.2	Velocidades de consumo	61
7.2.1.3	Balance de carbono	63
7.2.2	Consortio UAM	64
7.2.2.1	Rendimientos	64
7.2.2.2	Velocidades de consumo	65
7.2.2.3	Balance de carbono	67
7.3	Capacidad de la biomasa crecida en los S_{alt} para consumir MTBE	68
7.3.1	Consortio F	69
7.3.1.1	Rendimientos	69
7.3.1.2	Velocidades de consumo	70
7.3.1.3	Balance de carbono	72
7.3.2	Consortio UAM	73
7.3.2.1	Rendimientos	73
7.3.2.2	Velocidades de consumo	74
7.3.2.3	Balance de carbono	76
7.4	Efecto del glicerol en el consumo de MTBE.	78
7.4.1	Rendimientos	78
7.4.2	Velocidades de consumo	79
7.4.3	Consumo simultáneo de MTBE y glicerol	82

7.5 Efecto del glicerol en la formación de inóculo	83
7.6 Mantenimiento celular	85
7.7 Evaluación de la ruptura del aglomerado en las velocidades de consumo de MTBE	86
7.8 Determinación de TBA en fase líquida	88
7.9 Influencia del oxígeno y cobalto en la velocidad de consumo de MTBE	90
7.10 Observación morfológica de microorganismos presentes en el consorcio F por microscopía electrónica.	92
7.11 Estudios de microbiología convencional	93
7.12 Comparación poblacional de los consorcios microbianos en presencia y ausencia de glicerol por amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD)	96
8. Conclusiones	102
9. Bibliografía	106
10. Anexos	115
Anexo 1. Extracción de ADN de lodos	115
Anexo 2. Cálculos de CO ₂ (A) y velocidades de consumo (B)	116
Anexo 3. Análisis de varianza	117
Anexo 4. Análisis de varianza para la ruptura del aglomerado	118
Anexo 5. Consumo de MTBE en presencia de DEE	118
Anexo 6. Consumo simultáneo de MTBE y glicerol durante el 1º, 2do y 3er ciclo para el consorcio F	119
Anexo 7. Consumo simultáneo de MTBE y glicerol para el consorcio UAM	120
Anexo 8. Consumo de MTBE en presencia de cobalto	121
Anexo 9. Consumo de MTBE por población fúngica	121
Anexo 10. Análisis de varianza	122
Anexo 11. Análisis de varianza entre consorcios	122

Índice de figuras.	Páginas
Figura 1. Estructura química del MTBE	5
Figura 2. Ruta de degradación de DEE por Hardison y <i>col.</i> , 1997	20
Figura 3. Ruta de degradación de MTBE por Steffan y <i>col.</i> , 1997	21
Figura 4. Estrategia empleada a lo largo de los experimentos.	39
Figura 5. Reactor en lote	41
Figura 6. Sistemas experimentales (microcosmos)	42
Figura 7. Cámara de electroforesis horizontal	46
Figura 8. Periodo de adaptación para el consumo de MTBE	49
Figura 9. Eliminación de MTBE durante el segundo y tercer ciclo de adición.	52
Figura 10. Consumo MTBE ajustado por Gompertz.	56
Figura 11. Consumo de MTBE en presencia de HIBA	57
Figura 12. Consumo de MTBE en presencia de ISO	58
Figura 13. Consumo de MTBE en presencia de DEE	59
Figura 14. Consumo de MTBE en presencia de GLIC para el consorcio F.	59
Figura 15. Consumo de MTBE en presencia de GLIC para el consorcio UAM	65
Figura 16. Consumo de MTBE en presencia de los S_{alt} durante el quinto ciclo de adición simultánea para el consorcio UAM.	66
Figura 17. Consumo de MTBE durante el quinto ciclo de adición de MTBE como única fuente de carbono y energía para el consorcio F.	70

Figura 18. Consumo de MTBE en presencia de GLIC para el consorcio F	71
Figura 19. Consumo de MTBE en presencia y ausencia de GLIC	79
Figura 20 Ajuste del consumo de MTBE en presencia y ausencia de GLIC por Gompertz.	80
Figura 21. Consumo simultáneo de MTBE y GLIC.	82
Figura 22. Oxidación de MTBE después de ser alimentado con GLIC.	84
Figura 23. Ajuste por Gompertz del consumo de MTBE después de ser alimentado con GLIC.	84
Figura 24. Consumo de MTBE para los consorcios F y UAM bajo limitaciones de nutrientes.	85
Figura 25. Consumo de MTBE y TBA en fase líquida.	88
Figura 26. Regulación del metabolismo de MTBE por Francois y <i>col.</i> , 2003.	89
Figura 27. Consumo de MTBE en presencia de exceso de oxígeno.	91
Figura 28. Microfotografías del consorcio F	92
Figura 29. Fotografía de hongo y bacteria.	94
Figura 30. Cepa bacteriana aislada.	94
Figura 31. Perfil de bandas para el cebador FO1	97
Figura 32. Perfil de bandas para el cebador 6.1	99
Figura 33. Perfil de bandas para el cebador 6.2	100

Índice de tablas.	Páginas
Tabla 1. Medio mineral para el cultivo y mantenimiento microbiano.	40
Tabla 2. Rendimientos de biomasa-sustrato después del periodo de adaptación.	53
Tabla 3. Velocidades de consumo de MTBE después del periodo de adaptación.	54
Tabla 4. Rendimientos de biomasa-sustrato en la adición simultánea de los S_{alt} y MTBE para el consorcio F.	60
Tabla 5. Velocidades de consumo obtenidas por ajuste del modelo Gompertz en la adición simultánea de los S_{alt} y MTBE para el consorcio F	61
Tabla 6. Velocidades de consumo específicas en la adición simultánea de los S_{alt} y MTBE para el consorcio F	62
Tabla 7. Porcentajes de recuperación de carbono en la adición simultánea de las fuentes de carbono para el consorcio F.	63
Tabla 8. Rendimientos de biomasa-sustrato en la adición simultánea de los S_{alt} y MTBE para el consorcio UAM	64
Tabla 9. Velocidades de consumo específicas en la adición simultánea de los S_{alt} y MTBE para el consorcio UAM	67
Tabla 10. Porcentajes de recuperación de carbono en la adición simultánea de las fuentes de carbono para el consorcio UAM	68
Tabla 11. Rendimientos de biomasa-sustrato durante el incremento de inóculo para el consorcio F.	69
Tabla 12. Velocidades de consumo específicas para MTBE durante el incremento de inóculo para el consorcio F.	72
Tabla 13. Porcentaje de recuperación de carbono durante el incremento de inóculo para el consorcio F.	73

Tabla 14. Rendimientos de biomasa-sustrato durante el incremento de inóculo para el consorcio UAM	74
Tabla 15. Velocidades de consumo específicas para MTBE durante el incremento de inóculo para el consorcio UAM	75
Tabla 16. Porcentaje de recuperación de carbono durante el incremento de inóculo para el consorcio UAM.	76
Tabla 17. Rendimientos de biomasa-sustrato en presencia y ausencia de GLIC.	78
Tabla 18. Velocidades de consumo específicas para los consorcios F y UAM en presencia y ausencia de GLIC.	81
Tabla 19. Velocidades de consumo específicas para el consorcio F y UAM durante la homogeneización del aglomerado.	87
Tabla 20. Clasificación de muestras de los consorcios F y UAM en presencia y ausencia de GLIC para el RAPD.	96

GLOSARIO.

Ácido 2-hidroxiisobutírico	(HIBA).
Alcohol ter-butílico	(TBA).
Benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos	(BTEX).
Desnaturalización por gradiente en gel de electroforesis	(DGGE)
Di etil éter	(DEE).
Di isopropil éter	(DIPE).
Estados Unidos de Norte América	(EEUU).
Etanol	(EtOH).
Etil tert-butil éter	(ETBE).
Extracto de levadura	(ELEV).
Glicerol	(GLIC)
Hidrocarburos	(HC).
Isopropanol	(ISO).
Lactato	(LAC).
Metil tert-butil éter	(MTBE).
Monóxido de carbono	(CO).
Óxidos de nitrógeno	(NOx).
Radicales hidróxilo	(OH).
Sustrato alterno	(S _{alt}).
Ter amil alcohol	(TAA).
Tert-butil formato	(TBF).
Tert-amil metil éter	(TAME).

RESUMEN.

El objetivo de este trabajo fue favorecer el incremento de los rendimientos de biomasa-sustrato ($Y_{x/s}$), en consorcios microbianos capaces de degradar metil ter-butil éter (MTBE). Se emplearon dos consorcios F y UAM obtenidos de tierras contaminadas con MTBE, benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX) y gasolina. Los consorcios mostraron rendimientos iniciales de 0.1 g biomasa/g MTBE consumido.

El incremento de los rendimientos fue favorecido mediante el uso de sustratos alternos (S_{alt}) como el extracto de levadura (ELEV), lactato (LAC), di etil éter (DEE), isopropanol (ISO), ácido 2-hidroxiisobutírico (HIBA) y glicerol (GLIC). La biomasa fue evaluada por su capacidad de degradar MTBE mediante la velocidad de consumo específica. Éste fue uno de los principales parámetros para seleccionar el S_{alt} de interés ya que nos permitió comprobar que la biomasa generada en presencia del S_{alt} fue capaz de seguir oxidando al MTBE.

Los análisis realizados mostraron que en presencia de GLIC los consorcios F y UAM alcanzaron rendimientos de hasta 0.69 y 0.35 g biomasa/g sustrato consumido, con velocidades de consumo específicas de 30 y 50 mg MTBE/g biomasa/h, respectivamente. Estas velocidades fueron superiores al control (sólo con MTBE). También se demostró que el GLIC no ejerce inhibición por sustrato durante la oxidación del MTBE, tal como se observó en presencia de DEE, por el contrario el GLIC fue consumido de forma simultánea al MTBE. Se comprobó así mismo, que para incrementar la diversidad celular del inóculo con GLIC, no es necesaria la presencia del MTBE ya que los consorcios alimentados con este S_{alt} como única fuente de carbono y energía no pierden la capacidad de seguir oxidando el MTBE.

En estudios de microscopía electrónica se observó que la presencia de GLIC en el consorcio F favoreció el predominio de bacilos flagelados. Por otra parte mediante estudios convencionales de microbiología fue posible distinguir a dos poblaciones

microbianas (hongo y bacteria) capaces de degradar MTBE. Ambos microorganismos fueron encontrados en asociación y mostraron el mismo perfil de consumo que el consorcio F. La cepa bacteriana fue capaz de degradar 140 mg MTBE/L en aproximadamente una semana, después de mes y medio de adaptación.

Los estudios de biología molecular mostraron de forma preliminar que los consorcios microbianos tienen una composición poblacional diferente y que presentan selección poblacional a lo largo del tiempo. La presencia de GLIC en la mayoría de las condiciones estudiadas aparentemente no tuvo un efecto sobre la composición poblacional de ambos consorcios.

ABSTRACT

The purpose of this work was to increase the biomass yield ($Y_{x/s}$) in a microbial consortium capable to degrade methyl tert-butyl ether (MTBE). Two MTBE-degrading consortium were evaluated, F and UAM. The F-consortium was donated from the Riverside University and the UAM-consortium was obtained from MTBE, benzene, toluene, ethyl benzene and xylenes (BTEX) contaminated soils. Initial growth rates of around 0.1 g biomass/g MTBE were determine.

The biomass yield increment was evaluated using additional growth substrates (S_{alt}) such as the yeast extract (ELEV), lactate (LAC), di ethyl ether (DEE), isopropanol (ISO), 2-hydroxy-isobutyric acid (HIBA) and glycerol (GLIC). The obtained biomass was subsequently examined for MTBE oxidation by means of the specific consumption rate. This was one of the principal parameters to select the S_{alt} of interest, since this allowed to verify that the cells cultivated on the growth substrates (S_{alt}) were able to continue consuming MTBE.

When GLIC was used as growth substrate biomass yields of 0.69 and 0.35 g biomass/g consumed substrate were reached, and the specific activities were 30 and 50 mg MTBE/g biomass/h for F-consortium and for UAM-consortium, respectively. These specific rates were higher than the control (only with MTBE). It was also demonstrated that the GLIC does not inhibit the MTBE oxidation, as it was observed in the presence of the DEE. GLIC and MTBE were simultaneously consumed by the consortia. The biomass increment with GLIC allowed to maintain the MTBE degradation capacity even if MTBE was not added in the initial phase of growing.

Electronic microscopy photography's showed that the presence of the GLIC in the consortium F helped the predominance of lashed bacillus. In the other hand, using conventional microbiology techniques was possible to identify two microbial populations (fungus and bacteria) capable to degrade the MTBE. Both

microorganisms were found in association and showed similar consumption profiles of the F consortium. The bacterial isolates were able to degrade 140 mg of MTBE/L in a week, after 45 days of adaptation period.

The studies of molecular biology showed in a preliminary way, that the microbial consortiums have a different population composition and show a selection population composition with time. The presence of the GLIC in most of the studied conditions apparently did not have any effect over the population composition in both consortiums.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL MTBE.

El MTBE es también conocido como éter metil tert-butílico tiene un peso molecular de 88.15 g/mol y su estructura se muestra en la Figura 1.

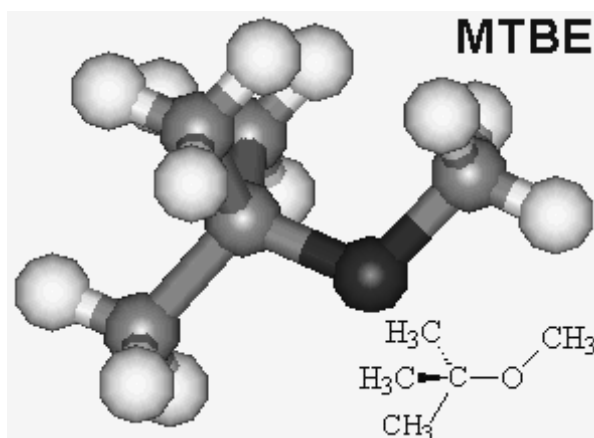


Figura 1. Estructura química del MTBE.

Este compuesto es producido por oxidación catalítica entre el metanol y el isobutileno. Es un compuesto volátil (251 mm Hg a 25°C), flamable e incoloro, detectable al olfato desde 5 ppb. El MTBE es miscible con la gasolina, el alcohol y otros éteres. Su gravedad específica es de 0.74 (a 25°C). Es soluble en agua, en rangos de 42-54 g/L (42000 a 54000 ppm). La constante de la ley de Henry para el MTBE a 5 y 25°C es de 0.0184 y 0.0197, respectivamente. El coeficiente de partición para octanol/agua ($\log K_{ow}$) se encuentra dentro de un rango muy limitado, de 0.94 a 1.16, lo que indica que el MTBE no se acumula comúnmente en un grado significativo en los tejidos de animales o humanos (Mackay y col., 1993), diversos estudios muestran que el MTBE tiene baja sorción en suelo y carbón orgánico, además de presentar baja biodegradabilidad como se verá con más detalle en la sección 2.2 (EEUU EPA 1998).

1.3 CONTAMINACIÓN AMBIENTAL.

En México a lo largo del siglo XX la población se incrementó hasta alcanzar 97.5 millones de habitantes en el año 2000 (INEGI 2000). Este incremento así como el desarrollo tecnológico provocaron el aumento en los índices de contaminación ambiental. De acuerdo con la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT 2002), las principales fuentes de contaminación del aire en zonas urbanas se dividen en móviles (principalmente vehículos automotores) y fijas (industrias); las primeras son las responsables del 84% de las emisiones totales. En la zona metropolitana del valle de México (ZMVM), para el año 2000 existían más de 3 millones de automóviles en circulación.

En nuestro país los principales contaminantes atmosféricos evaluados son: SO₂, CO, NO₂, ozono (O₃), PM10 partículas suspendidas totales (PST) y plomo (Pb). Para cada uno de estos contaminantes existen normas que establecen las concentraciones máximas que no deben sobrepasarse una vez por año, lo que garantiza la protección a la salud de la población (SEMARNAT, 2002). En México se utiliza un índice conocido como Índice Metropolitano de la Calidad del Aire (IMECA), que consiste en una transformación de las concentraciones del contaminante a un número adimensional. La calidad del aire se considera buena o satisfactoria cuando el valor IMECA está por debajo de 100, de 101 a 150 es regular o no satisfactoria, de 151 a 200 mala y de 201 en adelante se considera muy mala.

Las autoridades mexicanas iniciaron la lucha contra la contaminación atmosférica implementando el programa PICCA (Programa Integral contra la Contaminación Atmosférica) en 1991. Este programa incluye nuevas normatividades para la industria y los servicios, la utilización de incentivos fiscales para financiar la reconversión tecnológica, la utilización del programa hoy no circula y doble no circula, el programa de verificación vehicular, así como la normatividad de las gasolinas (SEMARNAT, 2002). En nuestro país se adicionó un 9% de MTBE en las gasolinas a partir de 1993 (Lacy.,1994).

De forma simultánea la Organización Mundial de la Salud y los Estados Unidos de Norte América (EEUU) desde los años 90's del siglo pasado han implementado normas para establecer la calidad del aire así como programas para disminuir los contaminantes liberados a la atmósfera. Las enmiendas a la ley del aire limpio (CAA) y la Agencia Federal de Protección Ambiental (EEUU, EPA) exhortaron a la disminución de los niveles de sulfuro y olefinas, así como la disminución de las emisiones de benceno, aromáticos totales, monóxido de carbono y ozono al medio ambiente (Fiorenza y Rifai, 2003; Hu y col., 2004).

Los oxigenantes propuestos para la sustitución del tetra-etilo de plomo fueron MTBE, ETBE y TAME, EtOH y TBA. De entre ellos se eligió el MTBE debido a su bajo costo, facilidad de producción y por sus características favorables de incorporación en la gasolina (Fortin y Deshusses 1999a; Fayolle y col. 2003). Este compuesto incrementa el octanaje debido a su contenido de oxígeno, lo que favorece la combustión y reduce las emisiones de contaminantes al ambiente (Fortin y Deshusses 1999a; Green y Lowenbach 2001),

A partir de 1995 en los EEUU se implementó el programa de gasolina reformulada el cual tuvo como objetivo la disminución de ozono, hidrocarburos y aire tóxico liberados al ambiente. El empleo de la gasolina reformulada favoreció la disminución de benceno, butadieno e hidrocarburos, sin embargo, se incrementó la presencia de formaldehído y MTBE (EEUU EPA 2000).

A partir de los años 90's del siglo pasado en los EEUU se incrementó el uso de las gasolinas reformuladas y en 1997 se estimó un consumo de 2×10^{16} galones al año (Hardison y col., 1997). Este incremento y las altas incidencias de derrames de gasolina reformulada de tanques de almacenamiento y durante las descargas, favorecieron la contaminación de las fuentes de agua, suelos y sedimentos (Hanson y col., 1999). El MTBE ha sido encontrado en la superficie del agua y en descargas de aguas contaminadas y aguas turbulentas, así como en lagos (Salanitro 1995).

1.4 CONTAMINACIÓN POR MTBE.

Las mayores fuentes de contaminación ambiental de oxigenantes están asociadas con la distribución, almacenamiento y uso de combustibles. La contaminación de MTBE por gasolina se da por los derrames desde los tanques de almacenamiento, las pipas de transporte y durante las descargas (Deeb y col., 2003)

En 1998 estudios realizados en el Lawrence Livermore National Laboratory mostraron que el MTBE es un contaminante común y frecuente en los ambientes acuáticos en California, encontrando al menos 10,000 sitios impactados en ese estado. En los EEUU se han puesto demandas donde se manifiesta que el MTBE es un contaminante común de aguas potables y difícil de eliminar. Datos obtenidos de U.S. Geological Survey's (USGS) y del National Water Quality Assessment Program (NAWQA) mostraron que el MTBE está presente en aproximadamente un 5% de las 2,743 muestras de agua subterránea tomadas y en 22 de los 42 estados muestreados. De forma similar, Johnson y col., 2000 mencionan que en un estudio realizado por la U.S Geological Survey's más de 9000 pozos en 31 estados de los EEUU pueden estar contaminadas con MTBE. Por ello identifican al MTBE como el segundo contaminante más común en acuíferos urbanos.

Deeb y col., 2003 reportan los resultados de un estudio realizado para el monitoreo de MTBE en tres estados; California, Massachussets y Maryland. Seleccionados en base a su distribución geográfica, las regulaciones existentes en el estado y datos de MTBE presentes.

En California se detectó MTBE en agua potable en concentraciones de 3, 5 y 13 $\mu\text{g/L}$. La concentración de MTBE en aguas superficiales se incrementó desde 1996 y hasta 1999, posteriormente los niveles de MTBE decrecieron. Este decremento se debe a nuevas regulaciones para la protección del agua. En agua subterránea se ha observado que desde 1996 y hasta el 1999 los niveles de MTBE se incrementaron pero a partir del 2001 los niveles se han mantenido. El estado de Massachussets tiene agua potable inmovilizada debido a su alta concentración de MTBE (70 $\mu\text{g/L}$). Estudios realizados entre el 2000 y 2001

indicaron que el 2% de las muestras de agua potable presentaron niveles detectables de MTBE ($>5 \mu\text{g/L}$). A partir de 1995 en Maryland se inició el monitoreo de MTBE en agua potable una vez que se detectó una concentración de $20 \mu\text{g/L}$. Los datos obtenidos en este estado asociados con el MTBE mostraron que desde 1995 el MTBE fue detectado en aproximadamente 100 muestras de agua potable de las 1200 examinadas. La presencia de MTBE en agua superficial se debe a negligencia. En años recientes aproximadamente 2-3% de las muestras de agua potable contienen MTBE en concentraciones superiores a los $20 \mu\text{g/L}$. En Maryland hasta el 1% del sistema de agua potable excede el tope federal de $20 \mu\text{g/L}$.

Una de las principales formas en que el MTBE se pierde de la fase acuosa es por volatilización, alrededor del 80% del MTBE se pierde entre las 2 o 3 primeras semanas después de su derrame (Fayolle y col., 2003; Fiorenza y Rifai 2003), sin embargo llega nuevamente al suelo debido a la lluvia. Su velocidad de migración es tal, que en estudios realizados por el Departamento de Ecología en Washington, en el que se inspeccionaron 62 sitios de almacenamiento de gasolina, se detectaron derrames de MTBE en casi todos ellos. Sin embargo en este estado no se usan gasolinas reformuladas, sólo se almacenan (Green y Lowenbach., 2001).

Achten y col., 2002 reportan que en estudios hechos en Alemania durante el periodo de 1999 al 2001 en 315 muestras de agua de ríos y 82 de aguas subterráneas se encontró MTBE en concentraciones de 250 y 200 ng/L, respectivamente. Las concentraciones más altas de MTBE fueron encontradas en las grandes zonas urbanas. La concentración de MTBE en la superficie de las aguas y aire en Alemania es de 3–17 veces menor en comparación con los datos obtenidos en California. Los autores mencionan que después de diversos estudios las autoridades en Alemania decidieron no implementar ninguna estrategia para el mantenimiento de las aguas potables ya que las concentraciones en las que se encuentra el MTBE son bajas, en comparación con datos obtenidos de los EEUU. Otra razón para la decisión tomada fue que en Alemania el porcentaje de MTBE

en la gasolina es significativamente bajo comparado con su uso en los EEUU. La producción de MTBE en Alemania en 1997 fue de 387,000 toneladas y se consumieron 349,400 para 1999 se consumieron 500,000 toneladas. La concentración promedio de MTBE en la gasolina es de 1.2-1.7% (p/p). El consumo de MTBE en Europa se ha incrementado en más del 23% entre 1995-1999.

En México existe poca información acerca de la presencia de MTBE en el ambiente. Se han detectado concentraciones en aire de 11.5 ppb y 4.4 ppb en estaciones de servicio y de vehículos de circulación, respectivamente. Se han encontrado concentraciones entre 4 y 87 mg/L en aguas de los alrededores de las estaciones de servicio (Razo-Flores y col., 2004)

En el invierno de 1988 se introdujo el MTBE en la gasolina. Este oxigenante favorecería la combustión y la disminución de contaminantes a la atmósfera pero su uso en vehículos sin catalizador acarreó la emisión de mayores niveles de NOx y de un contaminante altamente reactivo, el formaldehído (Bravo y Torres, 1990).

Schifter y col., 2000 realizaron una investigación en la ZMVM en la que evaluaron las emisiones generadas por vehículos automotores. Emplearon dos tipos de gasolina, una de bajo octanaje y la otra sin plomo, de grado regular. En ambas gasolinas emplearon 5, 10 y 15% de MTBE, en volumen. En la gasolina de bajo octanaje el 10% de MTBE favoreció la disminución del total de compuestos emitidos, mientras que en la gasolina regular el 15% fue el porcentaje más favorable. Los autores reportaron que las emisiones de Isobuteno, MTBE y formaldehído al ambiente se incrementaron con el uso de gasolina con MTBE; sin embargo, se observó la disminución de emisiones de monóxido de carbono de forma significativa y de hidrocarburos en menor grado. Los autores también mencionan que el beneficio es menos evidente en vehículos automotores viejos.

1.5 TOXICIDAD DEL MTBE.

Algunos compuestos, tales como los éteres (MTBE), el benceno y otros son liberados por tubos de escape y por la evaporación del combustible al medio ambiente. La exposición a los productos de la combustión química de la gasolina es considerada un problema de salud (EEUU EPA, 1994).

En 1994 la EEUU. EPA investigó los efectos del MTBE en la salud y reportaron que aún cuando no se habían realizado estudios en humanos que proporcionaran información de la potencialidad del MTBE para generar cáncer, los estudios realizados con ratones y ratas evidenciaron 3 tipos de tumores. Estos datos, aunque difíciles de interpretar, permitieron establecer que el MTBE es un posible cancerígeno humano por ser inhalado. Por esta razón la EEUU. EPA lo clasificó dentro del grupo C, que se basa en evidencia limitada y estudios en animales.

Estudios realizados con ratas y ratones sugieren que la ingestión de MTBE produce irritación gastrointestinal, daño al hígado y los riñones y efectos sobre el sistema nervioso. En el 2000, la EEUU. EPA anunció la posibilidad de eliminar el uso del MTBE en las gasolinas para el año 2003, sin embargo este plazo se extendió hasta diciembre del 2004. Actualmente los EEUU buscan eliminar el uso del MTBE sustituyéndolo por etanol, se espera que para el año 2012 se alcance un consumo de al menos 20,000 millones de litros de este biocombustible (Honty, 2004)

Los problemas generados por la presencia de MTBE en agua potable son principalmente que el olor se detecta a una concentración de tan solo 2 ppb; al ser inhalado provoca alteraciones en el sistema nervioso, irritabilidad en los ojos, fosas nasales y garganta, así como mareo, desorientación, vómito, dolores de cabeza y musculares y confusión mental. Sin embargo los niveles de exposición efectivos en estos casos no se conocen. En 1997, la EEUU. EPA estableció que la máxima concentración de MTBE permitida en agua potable sería de 20-40 ppb, ya que dicho rango de concentración no representa riesgos para la salud.

Amberg y col., 2000, estudiaron la toxicinética del MTBE y sus metabolitos en humanos después de la exposición oral. Los autores mencionan que dosis de 15 y 5 mg MTBE/100 mL de agua provocaron tiempos de vida media en el organismo de 0.6 y 0.75 h, respectivamente. También reportan la presencia de TBA como un metabolito de la degradación de MTBE con una vida media de 5.5 y 8 h, respectivamente. En muestras de orina también se observó la presencia de HIBA y 2-metil-1,2-propanodiol, sin embargo los autores no mencionan si existen efectos posteriores por la exposición al MTBE en los voluntarios.

2. MÉTODOS DE ELIMINACIÓN DEL MTBE.

A lo largo de los últimos 20 años se han emitido una gran diversidad de opiniones acerca de la biodegradabilidad del MTBE, por lo que se han publicado estudios de diversos tratamientos para eliminarlo. Estos tratamientos incluyen tanto procesos fisicoquímicos como biológicos.

2.1 PROCESOS FISICOQUÍMICOS.

Estas tecnologías han sido identificadas como potencialmente aplicables en la eliminación o destrucción de MTBE presente en sitios contaminados. Sin embargo estos estudios se han enfocado en concentraciones menores de 1000 $\mu\text{g/L}$ (Brown y col., 1997).

Smith y col., 1991, estudiaron la foto-oxidación de MTBE en la atmósfera mediante reacciones con radicales hidróxilo (OH). Los radicales hidróxilo se emplean para tratar bajas concentraciones de compuestos orgánicos en aguas contaminadas, ya que pueden oxidar un compuesto orgánico hasta monóxido de carbono (CO). El tiempo de vida media del MTBE en la tropósfera es de 3.9 días y los dos productos formados en presencia de NO_x fueron TBA y formaldehído.

Barreto y col., 1995, realizaron experimentos a escala laboratorio para determinar la efectividad de la degradación foto-catalítica del MTBE con dióxido de titanio como catalizador. Se empleó una concentración inicial de 82,000 $\mu\text{g/L}$ de MTBE de la cual el 76% fue degradado en los primeros 20 minutos y la completa eliminación se obtuvo hasta las 4 horas.

Watson 1996 reporta la eliminación de MTBE usando una combinación de luz ultravioleta y peróxido de hidrógeno en aguas subterráneas de un sitio en New Hampshire. El proceso requirió de un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 20 a 70 minutos para la eliminación del MTBE, dependiendo de la calidad del agua. Sin embargo se observó que este proceso requirió más de 120 veces la luz ultravioleta necesaria para la desinfección del agua de California.

El carbón activado granular también ha sido utilizado para la eliminación del MTBE presente en aguas con concentraciones de 1000 $\mu\text{g/L}$. Watson 1996, empleó una isoterma de adsorción para su eliminación, pero el carbón activado necesario para eliminar al MTBE es 21 veces más caro comparado con la eliminación de la misma masa de tricloroetano con el mismo sistema.

Otra alternativa fisicoquímica usada para la eliminación de MTBE son las resinas poliméricas insolubles en agua. Las gotas formadas tienen una matriz con una alta área superficial específica, similar a la del carbón activado y estas resinas pueden actuar como intercambiador iónico. El material de las resinas son los polímeros (poliestireno, polivinilpiridina, y polimetacrilato, etc), los cuales se seleccionan por su afinidad hacia el contaminante. De esta forma las resinas son capaces de adsorber el MTBE del agua. Esta es sin embargo una tecnología cara en comparación con las anteriores por lo que no es común su empleo.

La recuperación de contaminantes mediante el empleo de membranas, como ocurre en la ósmosis inversa y la nanofiltración, es un método potencial para la eliminación del MTBE. Se sabe que estos métodos son capaces de eliminar pesticidas e hidrocarburos clorados en concentraciones de 85 a 7 $\mu\text{g/L}$, sin embargo todavía no se conocen aplicaciones de esta técnica para la eliminación del MTBE (Brown y col., 1997)

Los sistemas de eliminación de MTBE mediante flujos de aire permiten la transferencia del contaminante desde el agua hacia la fase gaseosa. Esta técnica ha sido empleada para compuestos de gasolinas que son mucho más volátiles que el MTBE. Malley y col., 1993 en New Hampshire California emplearon una relación de aire-agua de 150:1 para eliminar un 60% del MTBE en una zona contaminada, utilizando un sistema de difusión de burbujas. Con este proceso, el MTBE sólo fue transferido a la fase gaseosa, por lo que debió ser tratado antes de descargarlo al ambiente. Estos tratamientos sin embargo, son costosos y complejos (Kinner, 2001).

Choi y col., 2000 emplearon un reactor con membrana polimérica para la descomposición de vapores de MTBE. La membrana estuvo constituida de alúmina y polipropileno, polisulfona o acetato de celulosa para determinar la descomposición del MTBE en la fase vapor. Los autores evaluaron la conversión de MTBE con el incremento de la temperatura de reacción y el decremento de la presión de reacción. La permeabilidad selectiva de metanol/isobuteno a través de cada membrana polimérica fue mayor en todas las temperaturas (60, 80 y 100°C) así como con el aumento de la presión parcial de MTBE. El porcentaje de conversión del MTBE se incrementó con el aumento de la temperatura de reacción y el decremento de la presión de reacción. La membrana cubierta con polipropileno mostró el mejor desarrollo en condiciones experimentales (Kinner, 2001).

2.2 PROCESOS BIOLÓGICOS.

La susceptibilidad del MTBE a la biodegradación es baja, como se ha mostrado en estudios recientes (Salanitro y col., 1994; Steffan y col., 1997; Hardison y col., 1997; Mo y col., 1997; Garnier y col., 1999; Hanson y col., 1999; Deeb y Alvarez-Cohen 2000; Bradley y col., 2001; Dupasquier y col., 2002) los mecanismos bioquímicos muestran que distintas enzimas con diferentes rangos de especificidad de substratos (monooxigenasas, dioxigenasas, peroxidasas, cotocromo P450) pueden romper los enlaces éter. En la reacción se incorpora un oxígeno y se produce subsecuentemente un hemiacetal, que dismuta espontáneamente en solución acuosa al alcohol correspondiente y al aldehído (Hatzinger y col., 2001)

Una alternativa a los procesos fisicoquímicos para la eliminación de MTBE es el empleo de microorganismos capaces de utilizarlo como fuente de carbono y energía. Se ha observado que cuando el oxígeno está presente puede ser usado como aceptor terminal de electrones, ya que produce la mayor cantidad de energía necesaria para el mantenimiento celular y el crecimiento. Además de que

las velocidades de algunas reacciones aerobias son mayores en comparación con las reacciones que no contienen oxígeno (Kinner, 2001).

Algunos investigadores han reportado cepas capaces de utilizar al MTBE como única fuente de carbono y energía, mientras que otros reportan la degradación cometabólica de MTBE.

Salanitro y col., 1994 lograron por primera vez aislar un consorcio microbiano, derivado de lodos activados de industrias de biotratamiento químico, llamado BC-1. En el consorcio se lograron identificar hasta cinco organismos (incluyendo corineformes, pseudomonas, y achromobacter) que de forma aislada no fueron capaces de crecer en MTBE como única fuente de carbono y energía. El consorcio fue capaz de degradar 120 mg/L de MTBE con una velocidad de 34 mg/g células/h y transformarlo en TBA, el primer intermediario de la degradación de MTBE. La concentración de TBA empezó a disminuir cuando el MTBE fue consumido por completo, con una velocidad de 14 mg TBA/g células/h.

A través de los diversos estudios para encontrar microorganismos capaces de degradar el MTBE ha sido posible identificar algunos de los intermediarios de su ruta de degradación. Resultados previos sugieren que la actividad monooxigenasa del citocromo P-450 es responsable de la degradación de MTBE a TBA (Salanitro, 1995). En la mayoría de los estudios se reporta al TBA como el primer intermediario de la ruta de degradación, sin embargo el TBF parece ser un intermediario transiente entre estos compuestos.

Salanitro en 1995 propuso por primera vez una ruta de degradación para el MTBE. En esta ruta el MTBE es transformado inicialmente a TBF, seguido del formaldehído o formato y el TBA; éste último es metabolizado vía alcohol isopropílico, acetona y piruvato hasta acetato y CO₂.

Hanson y col., 1999 reportan el aislamiento de una cepa pura llamada PM1 (miembro del subgrupo β 1 de las *Proteobacterias*) capaz de degradar MTBE como única fuente de carbono y energía. Esta cepa fue aislada de un consorcio

microbiano enriquecido en la composta de un biofiltro con vapores de MTBE. Los máximos rendimientos de biomasa reportados con MTBE como única fuente de carbono y energía fueron de 0.18 g/g. Esta cepa fue capaz de alcanzar velocidades de consumo de MTBE de 34 mg MTBE/ g células/ h. Los porcentajes de conversión de MTBE a CO₂ y biomasa fueron de 46 y 19%, respectivamente con un rendimiento celular de 0.18 mg células/mg MTBE consumido.

Church y col., 2000 proponen una ruta de degradación para MTBE, ETBE, TAME, DIPE y TAA, empleando un cultivo puro de la misma cepa PM1 mencionada en el trabajo anterior. En el caso de MTBE y ETBE el primer intermediario es el TBA, el cuál es transformado a ISO (al igual que el DIPE) para ser transformado hasta acetaldehído, acetato y CO₂. Por otra parte el TAME es transformado a TAA y acetona, acetaldehído, acetato y CO₂.

Hatzinger y col., 2001 evaluaron la degradación de MTBE y TBA con la cepa ENV735 y trataron de identificar factores que explicaran la persistencia del MTBE en el ambiente. Los autores sugieren que el MTBE y el TBA son oxidados por distintos sistemas enzimáticos en la cepa. La oxidación del MTBE por la cepa ENV735 ocurre de forma constitutiva, con una velocidad inicial de aproximadamente 86 nmol/min/mg proteína. La cepa convierte rápidamente el MTBE hasta CO₂, especialmente si el microorganismo se exponía previamente a TBA como fuente de carbono y energía. Los autores reportan pobres rendimientos de biomasa con MTBE y sugieren que ésto puede deberse a la carencia de flujos de rutas metabólicas para mineralizar eficientemente el MTBE. Debido a lo anterior adicionaron ELEV en un rango de 0.01 y 0.04% logrando incrementar los rendimientos de biomasa hasta 0.4 g/g. Estos resultados sugieren que es necesario el uso de cofactores o inductores para un crecimiento eficiente del microorganismo en MTBE. La velocidad de degradación de MTBE por la cepa ENV735 no fue afectada al ser incubada con formaldehído, monóxido de carbono o acetato.

François y col., 2002 reportaron que la cepa *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012, es capaz de degradar eficientemente MTBE, TAME y TAA. Durante el metabolismo de MTBE fue posible detectar TBF e HIBA.

Los autores reportaron que la presencia de cobalto favoreció el consumo de HIBA y el crecimiento, sin embargo no tuvo ningún efecto sobre la degradación de TBA. Los máximos rendimientos de biomasa (0.44 g biomasa/g MTBE) fueron obtenidos con MTBE como única fuente de carbono y energía. La velocidad específica de degradación de MTBE fue de 53 mg MTBE/g células/h. Los perfiles proteicos fueron similares cuando la cepa creció en MTBE y TBA, obteniendo polipéptidos con fuertes similitudes con oxidorreductasas conocidas de 66 y 27 kDa. Los autores reportan que en la degradación de MTBE con *M. austroafricanum* IFP 2012, el MTBE es transformado hasta TBF, formaldehído y CO₂, o TBA seguido de HIBA, biomasa y CO₂.

Fayolle y col., 2003 reportaron que la misma cepa anterior fue capaz de crecer en MTBE y TAME. Mostraron que fue necesario la presencia de cobalto para poder degradar al HIBA, el cual es un intermediario de la ruta de degradación del MTBE. Esta cepa presenta una fase de adaptación larga durante la cual se lleva a cabo la transformación del MTBE a TBA y no se observa crecimiento. Durante el consumo posterior de TBA existe un crecimiento rápido. La actividad degradadora para MTBE y TAME fue de 263 y 327 $\mu\text{mol éter/g biomasa/h}$. Los autores reportan el índice de energía de discrepancia que indica si la asimilación de carbono se lleva a cabo de forma eficiente (es la razón entre el rendimiento de biomasa teórico y el experimental). Si el valor es superior a 1 implica que hay pérdida de energía a través de la ruta de degradación. Para el MTBE el valor fue de 2.8 por lo que hay una deficiencia en la asimilación del carbono en la producción de biomasa. Los rendimientos experimentales de biomasa fueron de 0.15-0.3 g/g.

Como se observa en los estudios descritos anteriormente, la limitante en la degradación de MTBE son los bajos rendimientos de biomasa por lo que el cometabolismo es una alternativa para la degradación de MTBE. La degradación

de MTBE ha sido claramente demostrada en estudios de microcosmos por cometabolismo y con fuentes de carbono que mantengan al inóculo (sustratos de crecimiento).

El cometabolismo es la transformación de una sustancia no asimilable en presencia de un sustrato de crecimiento u otro compuesto transformable. Las sustancias no asimilables son aquéllas que no permiten el crecimiento celular.

Hardison y col., 1997 reportan que el hongo filamentoso *Graphium* sp cataliza la hidroxilación inicial de n-alcanos gaseosos (además de DEE y MTBE), por una enzima citocromo P-450 inducible. Sugieren que estas reacciones son catalizadas por la misma enzima citocromo P-450 y que la actividad alcohol deshidrogenasa involucra las futuras transformaciones de la oxidación inicial de los productos de cada sustrato. Mencionan que la reacción inicial en la oxidación de DEE es la O-alquilación para producir EtOH y acetaldehído (Figura 2). El rendimiento de biomasa obtenido para el consumo de DEE fue de 28.5 g de biomasa por mol de sustrato consumido y la máxima velocidad de oxidación de DEE fue de 85 nmol/h/mg peso seco. *Graphium* sp fue capaz de crecer en MTBE como única fuente de carbono y energía. La velocidad de consumo inicial de MTBE para el micelio incubado con n-butano fue de 0.6 nmol/h/mg peso seco y cuando sólo se empleó MTBE como fuente de carbono la velocidad de consumo fue de 1.9 nmol/mg peso seco/h. Se observó que después de 18 horas, el consumo se detuvo, sin embargo se reinició con la adición de n-butano.

La principal diferencia entre la degradación de MTBE y DEE observada para *Graphium* sp. es que el hongo aparentemente no puede utilizar los productos de la degradación de MTBE como fuente de carbono y energía para soportar el crecimiento.

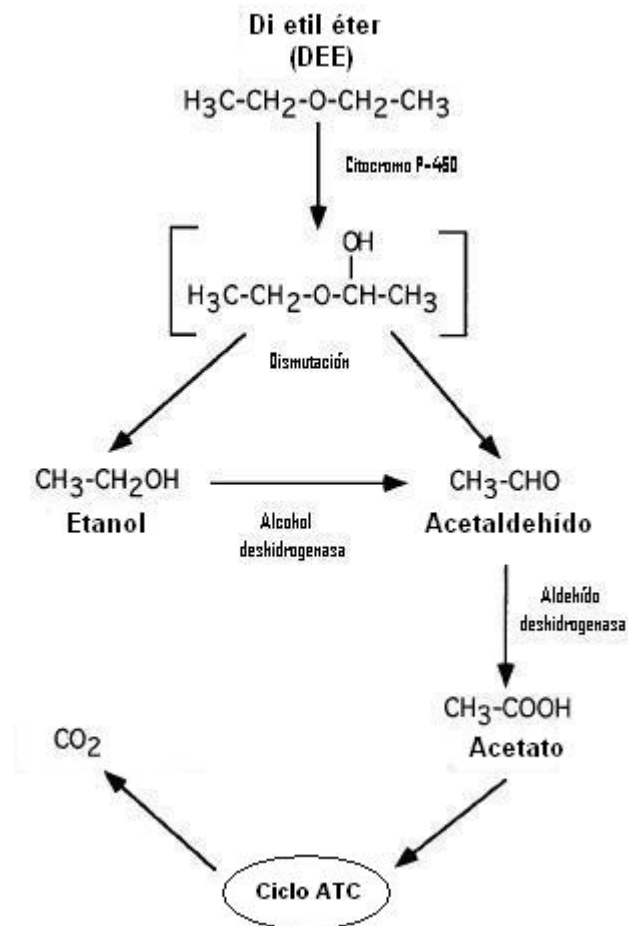


Figura 2. Hardison y col., 1997 proponen esta ruta para la degradación de DEE.

Steffan y col., 1997 evaluaron la capacidad de bacterias oxidantes de propano, para degradar MTBE, ETBE y TAME en estudios de laboratorio. Las cepas probadas fueron *M. vaccae* JOBS (ATCC29678), ENV420, ENV421, ENV425 (ATCC55798), *Pseudomonas putida* CAM, *Rhodococcus rhodochrous* 116, *Pseudomonas oleovorans* Gpo1 y *Pseudomonas mendocina* KR1. Todas las cepas probadas fueron capaces de degradar MTBE después de crecer previamente en propano. La cepa ENV425 incubada con 20 mg MTBE/L degradó MTBE sin fase de adaptación; inicialmente se observó la producción estequiométrica de TBA, con una velocidad de degradación de MTBE de 3.9 nmol/min/mg de proteína celular. Los autores también identifican el HIBA en la ruta

de degradación del MTBE (Figura 3), sugieren que éste puede generar ácido láctico como producto final. Además se incluye en la ruta a las monooxigenasas del propano para transformar el HIBA hasta propanol y ácido pirúvico.

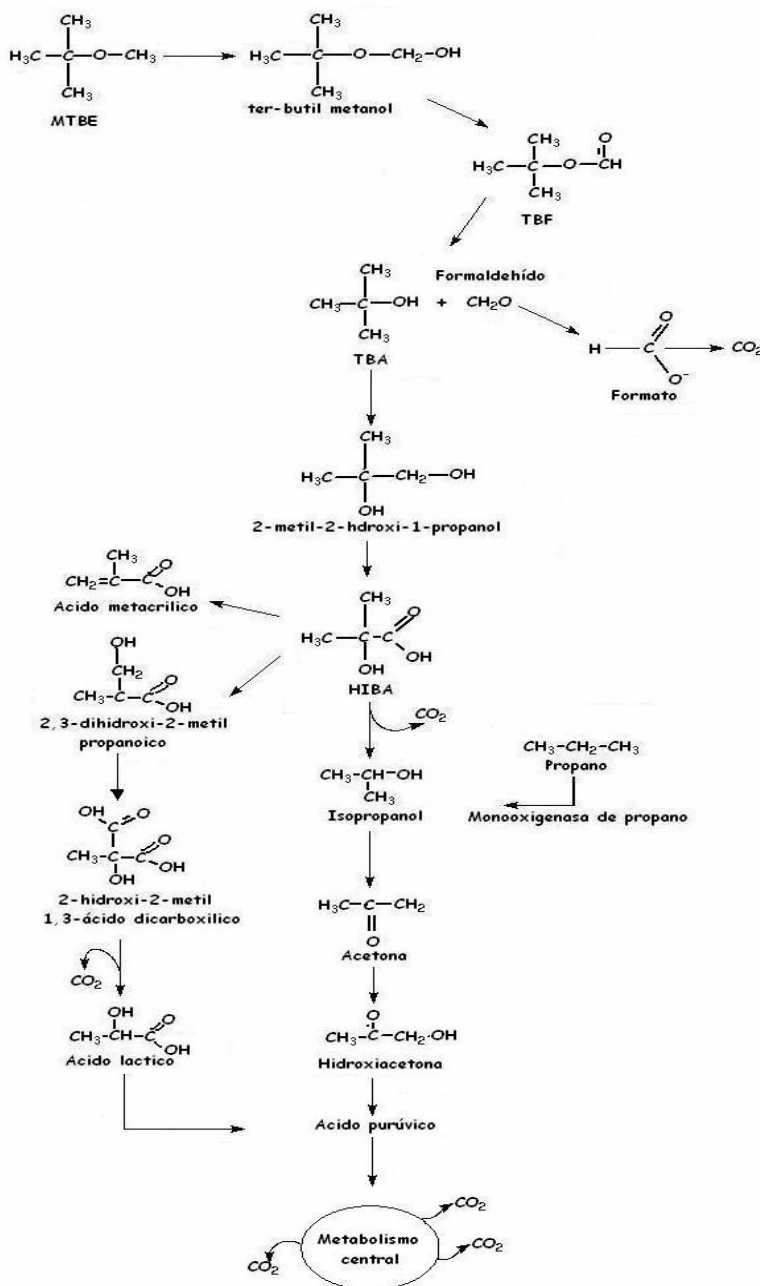


Figura 3. Ruta de degradación para MTBE, por Steffan y col., 1997

Autores como François y col., 2002 y Fayolle y col., 2003 coinciden con la ruta propuesta por Steffan y col., 1997 e incluyen al TBF como un intermediario transiente la oxidación del MTBE a TBA, tal como se muestra en la Figura 3.

Hyman y col., 1998 describieron el comportamiento de monooxigenasas inducidas en *M. vaccae* JOB5 y una cepa de *Xanthobacter* al crecer en propano. Los autores mostraron que las monooxigenasas responsables de la oxidación de los alcanos no son del tipo citocromo P-450. También, comprobaron que el TBF fue el primer intermediario de la degradación de MTBE, mientras que el TBA es producido y degradado bajo el mismo proceso de cometabolismo ya que es un sustrato para las monooxigenasas del propano.

Hyman y O'Reilly 1999, evaluaron la capacidad de diversos microorganismos que usan oxigenantes en sus rutas metabólicas. La degradación de MTBE fue observada por microorganismos que tienen la capacidad de crecer en alcanos gaseosos o isoalcanos, como *M. vaccae* JOB5, *A. eutrophus*, y *P. mendocina*. Los autores sugieren que la capacidad de crecer en alcanos es un buen indicador de que los microorganismos pueden degradar MTBE.

En la UAM, Garnier y col., 1999 aislaron una cepa bacteriana de suelos contaminados con gasolina. La cepa fue identificada como *Pseudomonas aeruginosa* y puede mineralizar aproximadamente el 28% de MTBE en presencia de pentano como fuentes de carbono y energía ya que se observa la acumulación de TBA. Los autores mencionan que las enzimas involucradas en la oxidación de MTBE y pentano tienen mayor afinidad por el segundo sustrato, lo cual se evidencia en los valores de K_s para MTBE y pentano que fueron de 185 y 2.9 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. Por otra parte, también mencionan que existe inhibición competitiva entre el MTBE y el pentano, lo que sugiere un sitio enzimático simple para los dos compuestos. La cepa es capaz de degradar 0.04 mg MTBE/mg proteína celular/h.

Deeb y Alvarez-Cohen, 2000 evaluaron el impacto de las interacciones positivas (cometabolismo) y negativas (inhibición) entre sustratos en las velocidades de biotransformación y mineralización de compuestos monoaromáticos de la gasolina y MTBE. Estos sustratos comúnmente coexisten en las plumas de contaminación en aguas subterráneas. Los autores emplearon un cultivo mixto y dos cultivos puros obtenidos de un acuífero contaminado con gasolina. Los tres cultivos fueron capaces de biotransformar los 6 compuestos de los BTEX, pero ningún cultivo fue capaz de biodegradar MTBE. Sin embargo concentraciones de MTBE de 20 a 100 mg/L no afectaron las velocidades de biotransformación de los BTEX.

Deeb y col., 2001 evaluaron también las interacciones de los BTEX con el MTBE. Utilizaron una cepa bacteriana PM1 la cuál, como se mencionó, es capaz de utilizar el MTBE como única fuente de carbono y energía. Solo en presencia de benceno y tolueno se pudo observar la degradación de MTBE, sin embargo la velocidad de degradación del compuesto disminuyó. La presencia de 20 mg/L de etil-benceno y xilenos impidió la degradación de MTBE. Esto sugiere que si los microorganismos en ambientes naturales se comportaran como en este estudio, para llevar a cabo la degradación de MTBE en las plumas de contaminación, éste debería migrar fuera de la pluma (5 y 1 mg/L/h para MTBE y benceno, se emplearon 20 mg/L de MTBE).

Morales y col., 2004 reportaron la mineralización cometabólica de MTBE por cultivos mixtos, obtenidos de muestras de suelos de sitios contaminados con gasolina en México. Las colonias fueron agrupadas en dos cultivos llamados M1 y M2 que fueron enriquecidos con pentano, hexano, isooctano y tolueno. Los cultivos fueron capaces de degradar MTBE en presencia de gasolina con velocidades de 117 y 80 mg/g proteína/h para M1 y M2, respectivamente. La degradación de MTBE en presencia de hexano e isooctano no fue completa y se observó la acumulación de TBA. En presencia de pentano el MTBE fue consumido después de 200 horas y el TBA fue totalmente degradado después de 250 horas. En presencia de tolueno el MTBE no fue transformado. Las velocidades de consumo específicas para el MTBE en presencia de pentano, hexano e isooctano

fueron de 49, 5.6 y 25 mg/g proteína/h para el cultivo M1 y de 35, 11.5 y 32 mg/g proteína/h para el cultivo M2. La conversión de CO₂ fue de 51%, 40% y 26% para pentano, hexano e isooctano, respectivamente.

2.3 REACTORES.

La eliminación biológica de éteres a partir de flujos gaseosos o acuosos contaminados, generados por operaciones de remediación ha sido probada tanto a nivel de laboratorio como a escala piloto. Los tratamientos *ex situ* implican el transporte de las aguas y suelos contaminados, los cuales pueden ser tratados mediante procesos de remediación. Durante estos tratamientos se han empleado diversos tipos de reactores biológicos (Fayolle y col., 2001; Kinner, 2001).

Los reactores de crecimiento suspendido emplean una alta concentración de células activas para biodegradar altas concentraciones de contaminantes orgánicos. Estos sistemas permiten que el cultivo suspendido este en contacto directo con el contaminante, el oxígeno disuelto y los nutrientes. Los reactores de película fija, contienen una superficie física que permite a los microorganismos formar la película. Estos reactores retienen bajas concentraciones celulares y pueden ser lavados y tener bajas velocidades de crecimiento (Stocking y col., 2000).

Fujiwara y col., 1984 emplearon un reactor de lodos activados para tratar efluentes con concentraciones de 100,000 µg/L de MTBE bajo condiciones aeróbicas, reportando que no fue posible degradar el contaminante.

Fortin y Deshusses, 1999a emplearon filtros biológicos de escurrimiento con un consorcio microbiano (obtenido de muestras de agua y material acuífero contaminado con MTBE, de Ontario Canada y Tustin CA.) el cual fue adaptado para el consumo de MTBE durante 6 meses. Inicialmente se le adicionaron 0.25 mg/L de ácidos húmicos como estimulantes del crecimiento y este consorcio fue capaz de degradar 50 g MTBE/m³/h. A lo largo del experimento se detectó un metabolito de la degradación de MTBE, posiblemente TBA. El consorcio degradó

TBA con una velocidad similar al MTBE. La velocidad de crecimiento específica en los dos módulos del biofiltro fue de 0.023 y 0.026 días⁻¹. El cultivo mostró bajos rendimientos de biomasa de 0.09 a 0.12 g/g, la actividad específica fue de 5.5×10^{-3} y 11×10^{-3} g MTBE/g peso seco/h, en los módulos respectivos. Los autores mencionan que las diferencias se deben al alto contenido de biomasa en el primer módulo del biofiltro.

Pitre y Steffan, 1999 realizaron estudios para evaluar un bioreactor de membrana a escala piloto. En esta investigación emplearon aguas contaminadas con MTBE del sureste de Texas, con concentraciones de 13,000 a 42,000 mg/L de MTBE. El inóculo fue la cepa ENV425, que es capaz de degradar MTBE y TBA. El ISO fue utilizado para mantener el crecimiento celular y con este sistema se lograron alcanzar eficiencias de remoción de hasta un 98% de una carga de 0.271 lb MTBE/lb MLSS (mezcla de líquidos de sólidos suspendidos)/día. La concentración final de MTBE en las aguas tratadas fue de 1.6 a 120 mg/L.

Steffan y col., 2000b describieron el uso de *Hydrogenophaga flava* ENV735 para el tratamiento *ex situ* de MTBE en corrientes acuosas. Los autores emplearon 0.1 g/L de ELEV para promover el crecimiento del microorganismo en MTBE. La eliminación de MTBE se llevó a cabo en un reactor de membrana de 85 L, con una velocidad de eliminación de 14 mg/L/h.

Hernández y col., 2000 reportaron la eliminación cometabólica de MTBE a nivel laboratorio y escala piloto. La velocidad cometabólica fue determinada para diversos compuestos orgánicos y mezclas, con tres cultivos puros y 2 consorcios. Los compuestos usados fueron; alcohol terbutílico, alcohol isoamílico, sec-butanol, pentano, dietil éter, 2-butanol y gasolina. Con los tres primeros no se observó degradación de MTBE, en presencia de los últimos cuatro fue posible observar la degradación cometabólica del contaminante. Los autores reportan un coeficiente metabólico máximo de 0.84 mg MTBE/mg sustrato en microcosmos. Los estudios en biofiltro mostraron la eliminación del 50% del MTBE y una capacidad de eliminación de gasolina de hasta 50 g CH₄/m³/h.

Fortin y col., 2001 reportaron la degradación de MTBE por un consorcio microbiano (F), que fue obtenido en los estudios reportados por Fortin y Deshusses (1999a y 1999b). La velocidad de degradación de este consorcio se obtuvo a partir de cinéticas de orden cero con una velocidad de degradación (K_0) de 2.8 mg/L/h para una concentración de 100 mg/L de MTBE. La concentración residual de MTBE en la mayoría de los casos fue menor a 50 $\mu\text{g/L}$ y durante los experimentos se detectó TBA en concentraciones de alrededor de 65 $\mu\text{g/L}$. La actividad específica del consorcio fue de 7 a 18 mg MTBE/g peso seco/h. El rendimiento de biomasa obtenido para el consorcio F fue de 0.11 g peso seco/gMTBE. Los autores mencionan que la bioremediación de compuestos recalcitrantes requiere el enriquecimiento de los cultivos microbianos, seguido por la determinación de sus parámetros cinéticos y metabólicos. El consorcio F provino de un biofiltro de lecho escurrido a escala laboratorio, la biomasa empleada fue enriquecida en un reactor en lote con un sistema de oxigenación a través de manguera de silicón. Este consorcio es un cultivo mixto estable que no cambia sus características macroscópicas a lo largo del tiempo. El cultivo original fue enriquecido con muestras de sitios contaminados con MTBE. Los autores evaluaron el efecto del DEE como S_{alt} y observaron que el MTBE sólo se degradó después de la completa eliminación de éste. Lo anterior sugiere que la ruta de degradación del MTBE está sujeta a algún tipo de represión catabólica. El rendimiento de biomasa obtenido después del empleo de DEE fue de hasta 0.6 g/g, aunque el incremento en biomasa no fue acompañado por una mayor tasa de consumo de MTBE.

Dupasquier y col., 2002 realizaron estudios de biofiltración para eliminar vapores de MTBE por cometabolismo con pentano, empleando un cultivo degradador de pentano de *Pseudomonas aeruginosa*, obtenido de muestras de suelo contaminados con gasolina. El pentano y el MTBE se alimentaron al biofiltro mediante una corriente de aire. Las capacidades de eliminación para el MTBE fueron de 0.3 a 1.8 $\text{g/m}^3/\text{h}$, para una carga de 1.1 a 12.3 g/m^3 y durante los experimentos se demostró que la degradación del MTBE sólo puede llevarse a

cabo en presencia de pentano como previamente había sido descrito por Garnier y col., 1999. Las capacidades de eliminación de MTBE fueron inhibidas con altas concentraciones de pentano. Cuando la concentración de MTBE se incrementó hasta 20 g/m^3 el porcentaje de eficiencia de remoción disminuyó de 60 a 20 % y de 20 a 6%, respectivamente.

Hu y col., 2004 reportan el estudio de un biofiltro a escala laboratorio hecho de una fibra natural (Kenaf) inoculado con microorganismos degradadores de MTBE. En este estudio se evaluó el efecto de ciertos parámetros tales como la concentración de oxígeno, el TRH, la concentración de ELEV y la concentración inicial de MTBE. Emplearon cuatro modelos cinéticos para evaluar la eliminación del MTBE en el reactor. El formaldehído y el TBA no fueron encontrados en el efluente y el dióxido de carbono fue evaluado como producto final. Los resultados se basaron en el balance de masa. Los autores incluyen al ELEV como una fuente de carbono alternativa para promover el crecimiento microbiano (en concentraciones de ELEV de 0, 0.75 y 1.3 g/L). El ELEV promovió el crecimiento microbiano, algo esencial para la degradación del MTBE, aunque los autores mencionan que la bio-película puede saturarse o llegar a condiciones de estado estacionario. Finalmente concluyen que el ELEV no incrementó la biodegradación de MTBE, ya que los resultados estadísticos indican que no existen diferencias significativas en los porcentajes de eliminación de MTBE y que las mayores velocidades de remoción se obtuvieron sin ELEV.

2.4 ESTUDIOS EN CAMPO.

Por otra parte, algunos estudios recientes en sitios contaminados han mostrado que la biodegradación del MTBE puede llevarse a cabo de forma natural. Estudios de atenuación natural muestran que el MTBE presenta diferentes valores de vida media dependiendo del ambiente contaminado; su vida media estimada en la superficie del agua es de 14 días, 3 en la atmósfera, pero hasta 2 años en aguas contaminadas, comparado con el benceno que tiene una vida media en agua de 2 o 3 meses (Fayolle y col., 2003).

El monitoreo de la degradación natural o atenuación del MTBE en acuíferos contaminados con gasolinas muestra que los BTEX son degradados antes que el MTBE. En algunas ocasiones el MTBE no se degrada por completo. Hitzig y col., 1998 reportaron que en un trabajo realizado en Ontario Canada, los BTEX fueron significativamente oxidados en los primeros 16 meses, lo que no sucedió con el MTBE. Después de 7 años se observó que la concentración de MTBE disminuyó hasta 200 $\mu\text{g/L}$ de los 1000 $\mu\text{g/L}$ iniciales.

Se ha observado que cuando el oxígeno está presente puede ser usado como aceptor terminal de electrones ya que produce la mayor cantidad de energía necesaria para el mantenimiento celular y el crecimiento (Kinner, 2001). Sin embargo muchos acuíferos contaminados no contienen cantidades significativas de oxígeno por lo que se han encontrado básicamente dos métodos que se pueden utilizar para favorecer la biodegradación de MTBE en estos sitios el bioestimulación y la bioaumentación. El primero es una estrategia de remediación, que permite incrementar los microorganismos capaces de degradar el contaminante con la introducción de aceptores de electrones, nutrientes y/o co-sustratos. En el segundo método se aumenta la actividad de los microorganismos introduciendo organismos que sobrevivan, compitan y degraden los contaminantes (Stocking y col., 2000).

Javanmardian y Glasser 1997, investigaron la posibilidad de la degradación *in situ* de MTBE en Michigan usando un bioventeo para suministrar oxígeno en aguas subterráneas durante un periodo de 3 meses. Después de este periodo, la concentración de MTBE decreció hasta niveles por debajo del límite de detección. Experimentos en microcosmos con microorganismos del lugar mostraron la capacidad de degradar el MTBE en concentraciones de hasta 10 mg/L con un tiempo de vida media de 30-45 días.

Una nueva tecnología para adicionar oxígeno en acuíferos contaminados es la inyección de compuestos liberadores de oxígeno (ORC). Esta técnica consiste en usar peróxido de magnesio (MgO_2) y con ella el MTBE ha sido degradado de 800 a menos de 2 $\mu g/L$ en menos de 9 meses (Koenigsberg y col., 1999).

Salanitro y col., 1999 emplearon un cultivo llamado BC-1 para la bioremediación *in situ* de MTBE en California. Los autores emplearon bio-barreras de 6 metros de longitud que suministraban oxígeno a la pluma contaminada con MTBE. Después de 261 días la concentración de MTBE fue de 2-9 mg/L a 10 $\mu g/L$. La concentración de TBA fue menor de 10 $\mu g/L$ y con estos resultados se mostró la eficiencia de las bio-barreras conteniendo microorganismos selectivos de bioremediación.

Salanitro y col., 2000 reportan asimismo un estudio de bioaumentación en una pluma de contaminación con MTBE de 1500 m en Port Hueneme (CA). Los autores evalúan la degradación de MTBE bajo distintas condiciones en tres zonas. La primera de ellas sin tratamiento, la segunda con adición de O_2 para incrementar los niveles superiores a 20 mg/L y la tercera con adiciones de O_2 y de un cultivo microbiano llamado MC-100. La concentración inicial de MTBE fue de 2-9 mg/L. Los niveles de MTBE decrecieron para la segunda zona hasta 0.001-0.1 mg/L después de 186-261 días. En la tercer zona la concentración de MTBE decreció después de 30 días y hasta 261 alcanzando concentraciones de 0.001-0.01 mg/L. En esta zona la concentración de TBA disminuyó a concentraciones menores de 0.01 mg/L.

2.5 DEGRADACIÓN ANAEROBIA DE MTBE.

La importancia de la biodegradación anaerobia del MTBE se debe principalmente a la ligera atenuación natural en los sitios contaminados con gasolinas, debido a que se forman plumas del contaminante en el subsuelo bajo condiciones anaerobias.

Suflita y Mormile en 1993 mostraron que el MTBE no puede ser degradado bajo condiciones anaerobias por sedimentos de acuíferos o cultivos bacterianos. Determinaron que los átomos de carbono terciarios o cuaternarios son más recalcitrantes que los ramificados o ligeramente ramificados, así como que los éteres son moléculas persistentes a la degradación anaerobia. En este mismo experimento el TBA no fue degradado después de 252 días de incubación.

Yeh y Novak, 1994 estudiaron la degradación de MTBE bajo condiciones metanogénicas en tres diferentes suelos. Emplearon suelos con bajo contenido de materia orgánica en donde la degradación del MTBE siguió una cinética de primer orden. El tiempo de vida media para el MTBE fue de 120 días.

Mormile y col., 1994 emplearon sedimentos anaerobios (muestras de un río de Ohio) y dos cultivos puros (*Acetobacterium woodii* y *Eubacterium limosum*) capaces de metabolizar éteres para la degradación de MTBE. En este estudio sólo un 50% del MTBE (73 µg/L) fue transformado a TBA después de 152 días de incubación. Pero ninguna de las dos cepas fue capaz de degradar el MTBE.

Finneran y Lovley, 2001 estudiaron la degradación anaerobia de MTBE y TBA empleando sedimentos de acuíferos contaminados con petróleo así como sedimentos acuáticos. Observaron que el MTBE sólo se degradó por los sedimentos acuáticos en presencia de sustancias húmicas y Fe(III), después de un periodo de adaptación de 250-300 días. Estos sedimentos transformaron rápidamente el TBA hasta CO₂ y CH₄, sin fase de adaptación.

Bradley y col., 2001 estudiaron la biodegradación de MTBE en sedimentos de aguas superficiales de tres sitios (Campo Cecil, Oasis y Picatinny Arsenal). El MTBE sólo se transformó hasta TBA con velocidades de 30, 33 y 11 nmol d⁻¹ en las muestras de cada uno de los sitios. Bajo condiciones anóxicas con reducción de SO₄⁼ y NO₃⁼ se observó una mineralización significativa de MTBE.

3. MONITOREO DE POBLACIONES BASADAS EN TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

La caracterización de los ecosistemas microbianos se ha realizado básicamente por técnicas que están divididas en dos categorías basadas en características fenotípicas y genotípicas. Esta última permite la secuenciación del genoma de cada cepa, si dos individuos tienen exactamente la misma secuencia en sus cromosomas y elementos extracromosomales se trata de la misma cepa. Las técnicas moleculares permiten identificar directamente a bacterias individuales en muestras ambientales, sin requerir de su crecimiento inicial en medios de cultivo (Theron y Cloete 2000). Estas técnicas incluyen la hibridación de DNA, el análisis de enzimas de restricción, perfil de plásmidos, la huella digital de DNA obtenida por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con un primer arbitrario como la ampliación al azar de DNA polimórfico (RAPD) y gradiente de desnaturalización en un gel de electroforesis (DGGE)(Wong y col., 1996).

El PCR provee una ruta de amplificación de secuencias de ácidos nucleicos mediante el uso de primers que indican la secuencia objetivo a aumentar. Durante el proceso los ciclos repetidos de desnaturalización de DNA, el alineamiento de los primers al DNA objetivo y la extensión de éstos a través de la secuencia objetivo tienen como resultado un gran incremento de estas secuencias de interés. Los primers específicos han sido usados para amplificar genes completos extraídos de muestras naturales de organismos específicos o grupos de organismos en muestras ambientales. Aunque el método es específico y sensible las reacciones estándar de PCR no son cuantitativas.

La ruta fácil de detección de secuencias de ácidos nucleicos microbianos es la hibridación directa de una sonda. Las sondas son una simple unión de ácidos nucleicos con el potencial de acarrear moléculas marcadas altamente específicas para complementar la secuencia de DNA o RNA blanco.

El DGGE es una técnica por el cual los fragmentos de DNA de longitudes idénticas o casi idénticas, pero de diferente composición secuencial pueden ser resueltas por electroforesis. Esta técnica ha sido empleada para la ampliación por PCR de los genes 16S de rRNA de muestras ambientales. La separación se basa en cambios en la movilidad electroforética de los fragmentos de DNA que migran en el gel vertical de poliacrilamida que contiene un incremento lineal en la concentración del desnaturalizante (formamida y/o urea) de DNA. Esta técnica provee un método rápido para caracterizar la estructura de comunidades poblacionales. La identificación de organismos asociados con alguna banda en particular es posible, así como perturbaciones ambientales ocurridas en comunidades microbianas (Theron y Cloete, 2000).

El RAPD nos permite diferenciar entre individuos de la misma especie que hayan mutado. Esta técnica ha sido aplicada para el mapeo genético, taxonómico, filogenético, epidemiológico, detección de mutaciones y diferentes expresiones genéticas. En este método se selecciona de forma arbitraria a un simple oligonucleótido o par de oligonucleótidos que son usados como cebadores en el PCR, durante la reacción los primers se alinean a sitios complementarios para iniciar la copia de la nueva cadena de DNA (Wong y col., 1996). Esta técnica permite hacer diferenciación por debajo del nivel de subespecie. Sin embargo los patrones de bandas no son siempre reproducibles debido a que el método es muy sensible a pequeñas variaciones en la concentración y pureza del DNA blanco así como a la concentración del Mg^{+2} y en la temperatura (Breen y col., 1995).

Estas técnicas han sido empleadas para identificar a microorganismos responsables de la oxidación de MTBE tal como lo reportan; Chauvaux y col., 2001 quienes aislaron una cepa bacteriana (*Rhodococcus ruber*) capaz de eliminar ETBE como única fuente de carbono y energía. Esta cepa es capaz de degradar MTBE, TAME y TBA después de crecer en ETBE. Demostraron que las enzimas responsables del consumo del ETBE llevan a cabo la degradación de MTBE mediante la eliminación de un gen inestable de citocromo P-450 responsable de la degradación de ETBE, la eliminación del gen fue llevada a cabo

por la introducción de un plásmido construido por PCR. Esta cepa pierde fácilmente la habilidad de degradar ETBE. La pérdida coincide con la eliminación de un segmento de DNA llamado ethRABCD. Los genes ethABC codifican para una ferredoxin reductasa, una citocromo P-450 y una proteína de 10 K-Da de la cuál no se conoce su función. La eliminación de este fragmento de DNA también provoca la inhabilidad de la cepa para degradar MTBE, lo cuál indica que el sistema enzimático afectado es responsable de la degradación de ambos sustratos. La degradación de los compuestos sólo se realiza hasta TBA el cuál se acumula en el medio de cultivo. Los autores afirman que la clonación de los genes eth ofrecen la oportunidad de degradar ETBE.

Beguin y col., 2003, reportan el estudio de genes ethRABCD implicados en la degradación de éteres de la gasolina por bacterias del grupo *Mycobacterium* y *Rhodococcus*. Identificaron un grupo de genes que codifican para un sistema monooxigenasa citocromo P-450 y lo clonaron en la cepa *Rhodococcus ruber* IFP 2001. Dos grupos altamente conservados de los genes eth fueron detectados en las cepas que utilizan ETBE (*Rhodococcus zopfii* IFP 2005 y *Mycobacterium* sp. IFP 2009). El grupo eth fue insertado en diferentes contextos genómicos, sugiriendo que este puede ser transferido horizontalmente entre especies e insertado en diferentes sitios del genoma. *Rhodococcus ruber* IFP 2001 fue capaz de degradar ETBE e iniciar el rompimiento de MTBE y TAME sin embargo, estos sustratos no soportaron el crecimiento, esta cepa en presencia de etanol o isopropanol como sustrato de crecimiento fue capaz de mineralizar completamente al MTBE. Por otra parte un análisis espectrofotométrico de extracto crudo de *R. ruber* IFP 2001 reveló la presencia de una citocromo P-450 inducida por crecimiento en ETBE, sugiriendo que este se encuentra involucrado en el metabolismo del sustrato. Después de cultivar la cepa *R. ruber* IFP 2001 por 60 generaciones en caldo LB entre 20-100% de los clones reaislados mostraron su inestabilidad para crecer en ETBE como única fuente de carbono, también se observó que las mutantes pierden la habilidad de degradar MTBE y TAME. Todas las mutantes mostraron la misma eliminación de un fragmento de 15 Kba. Los autores confirman que el grupo de genes ethRABCD fue el responsable de la

utilización de ETBE, ya que el fragmento de ADN correspondiente fue insertado en un vector y el plásmido recombinado fue introducido en la negativa para ETBE, eliminando así a la mutante. La cepa transformada recuperó la habilidad para crecer en medio mínimo con ETBE como fuente de carbono.

4. JUSTIFICACIÓN

El metil ter-butil éter (MTBE) es un compuesto químico cuya molécula posee en su estructura dos grupos funcionales; el enlace éter y la estructura terbutílica. El MTBE es un compuesto utilizado como oxigenante en la gasolina reformulada ya que provee un 2% (peso/peso) de oxígeno lo que favorece su oxidación. Ha sido empleado para sustituir al plomo, incrementar el índice de octano y reducir la emisión de sustancias tóxicas al ambiente, como los compuestos orgánicos volátiles, olefinas y benceno (Fortin y col., 2001).

Los frecuentes derrames de gasolina reformulada desde tanques subterráneos y lugares de abastecimiento han provocado contaminación de suelos y mantos acuíferos. El MTBE contenido en la gasolina puede filtrarse a través del subsuelo, debido a su alta solubilidad en agua, alcanzando así aguas subterráneas desde donde llega a centros de distribución para el consumo humano. Su lenta retención en materia orgánica y su baja biodegradabilidad hacen que el MTBE constituya un contaminante de difícil eliminación (Hatzinger y col., 2001). La relativa dificultad para oxidar o reducir el MTBE por ataque microbiano es inherente a su estructura química, ya que contiene una combinación de 2 grupos funcionales orgánicos biorecalcitrantes.

Como se pudo ver en la introducción, sección 1 se han realizado diversas investigaciones para encontrar microorganismos capaces de degradar MTBE en donde el uso de consorcios microbianos presenta una solución, sin embargo en todos los casos se han reportado bajos rendimientos de biomasa (0.1-0.2 g/g) para su consumo como única fuente de carbono y energía así como velocidades de crecimiento relativamente lentas (Fortin y col., 2001). Por lo que en este trabajo se planteó el uso de un S_{alt} al MTBE con el fin de incrementar los rendimientos de biomasa ($Y_{x/s}$) capaz de degradar MTBE, con esto obtendremos biomasa activa y en menor tiempo. Los S_{alt} estudiados serán LAC, ELEV, HIBA, ISO, DEE, y GLIC evaluando su efecto sobre la velocidad de consumo de MTBE y el incremento en

biomasa. Sin embargo el uso de S_{alt} puede provocar que los consorcios pierdan la capacidad de consumir MTBE.

5. OBJETIVOS.

5.1 OBJETIVO GENERAL:

- Favorecer el incremento de biomasa de consorcios microbianos capaces de eliminar MTBE mediante el uso de fuentes de carbono alternas (S_{alt}).

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

- Evaluar el efecto de la presencia de los S_{alt} durante el consumo de MTBE.
- Evaluar el incremento en biomasa debido al S_{alt} .
- Evaluar la capacidad de la biomasa generada por el S_{alt} para eliminar MTBE, mediante las tasas de consumo específicas.
- Evaluar la presencia de TBA durante la eliminación de MTBE.
- Observar poblaciones responsables del consumo de MTBE.
- Comparar las poblaciones microbianas presentes en los consorcios F y UAM por técnicas de microscopía electrónica y biología molecular.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

Los experimentos realizados a lo largo del presente trabajo se llevaron a cabo empleando dos consorcios microbianos (F y UAM), de los cuales se sabía tenían la capacidad de consumir MTBE como única fuente de carbono y energía. Las muestras obtenidas de ambos consorcios se depositaron en botellas pyrex de 2L con 400 mL de medio mineral y MTBE, las cuales fueron empleadas para adaptar la biomasa empleada como inóculo en cada experimento. Durante los experimentos se emplearon fuentes de carbono alternas (S_{alt}), para obtener una mayor cantidad de biomasa con la capacidad de consumir el MTBE, por lo que se evaluó la velocidad de consumo específica y los rendimientos de biomasa tanto en el control (sólo con MTBE) como en los sistemas que contenían al S_{alt} . Como se muestra en la Figura 4 inicialmente sólo evaluamos el efecto de los S_{alt} en el consorcio F, durante la etapa de adaptación, ya que este consorcio se encontraba en una etapa de stress. En esta etapa el consorcio tenía una semana de adaptación bajo las condiciones señaladas anteriormente. Posteriormente (cuatro meses de adaptación) para ambos consorcios, se evaluó el efecto de los S_{alt} , al ser adicionados de forma simultánea al MTBE. El siguiente experimento se llevó a cabo a los siete meses de adaptación y nos permitió evaluar nuevamente el efecto de los S_{alt} en la generación de inóculo. De estos experimentos, se seleccionó un S_{alt} como la fuente de carbono que nos permitiría obtener una mayor cantidad de biomasa activa. Una vez seleccionado el S_{alt} que nos permitiría obtener una mayor cantidad de biomasa activa y en menor tiempo, se realizaron experimentos sólo con este sustrato y el MTBE en ambos consorcios. A los diez meses de adaptación para el consorcio UAM y un mes para el consorcio F se evaluó nuevamente la presencia del S_{alt} en la velocidad de consumo específica del MTBE y los rendimientos de biomasa, así como su capacidad de consumir el MTBE. Posteriormente se realizó la comparación poblacional de los consorcios microbianos por biología molecular, de muestras obtenidas a los dos meses y al año de ser alimentados con MTBE y la fuente de carbono alterna seleccionada,

también se llevó a cabo el aislamiento de cepas de los consorcios. Por microscopía electrónica observamos las poblaciones microbianas en el consorcio F cuando fue alimentado con MTBE y MTBE más el S_{alt} . Por otra parte cuando ambos consorcios se encontraban a un mes de adaptación se evaluó la acumulación de TBA durante el consumo de MTBE, así como la influencia de la ruptura del aglomerado y el incremento en cobalto y oxígeno, en las velocidades de consumo específicas del MTBE.

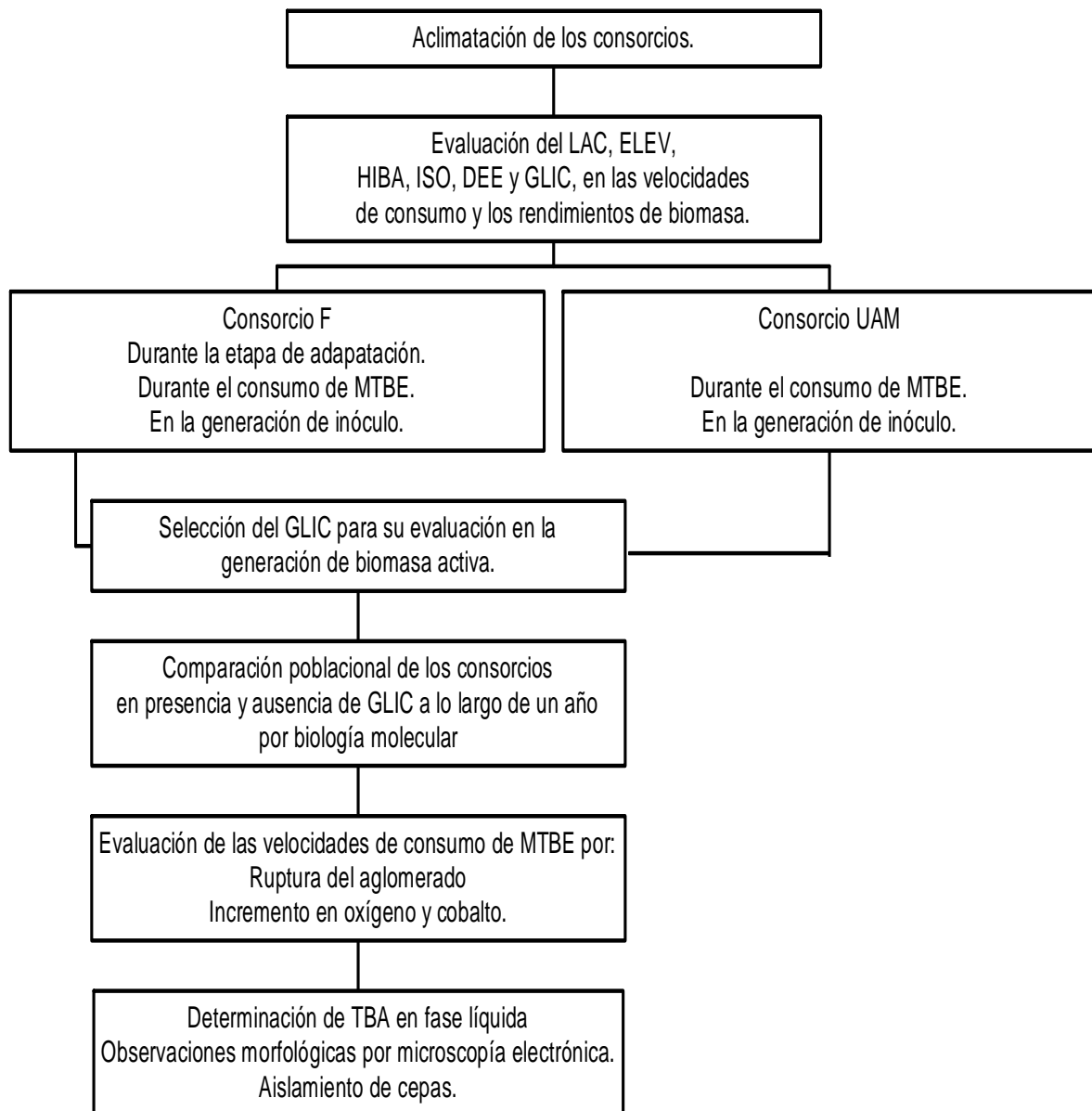


Figura 4. Estrategia empleada a lo largo del desarrollo experimental.

6.2 MATERIAL BIOLÓGICO.

El consorcio F, donado por la Universidad de Riverside en California, fue obtenido inicialmente de dos muestras de tierra: la primera de un borde acuífero en Ontario Canadá, al cuál en 1988 se le inyectó MTBE y BTEX y la segunda de suelos contaminados con MTBE en Tustin CA. Las dos muestras de tierra fueron mezcladas con piedra volcánica e introducidas en un biofiltro durante seis meses con MTBE como única fuente de carbono y energía (Fortin y col., 2001).

El consorcio UAM se obtuvo de tierras contaminadas con gasolina donadas por el Instituto Mexicano del Petróleo (IMP) y muestras del inóculo de un biofiltro operado con pentano y MTBE. La mezcla se enriqueció con gasolina durante 3 meses y posteriormente sólo con MTBE en medio mineral líquido.

6.3 MEDIO DE CULTIVO.

El medio de cultivo empleado durante los experimentos fue una modificación del descrito por Fortin y Deshusses 1999. En él se sustituyó como fuente de nitrógeno al amonio por nitrato. Su formulación se muestra en la siguiente Tabla.

Tabla 1. Medio mineral de cultivo y mantenimiento.

Elementos traza	g/L	Modificado	g/L
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.2	K_2HPO_4	2
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.44	KH_2PO_4	1
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.8411	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.2621	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1
H_3BO_3	0.0620	KNO_3	2.3
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.09	YNB	0.1
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.49	Trazas	5 mL

6.4 SISTEMAS EXPERIMENTALES.

6.4.1 REACTORES.

Ambos consorcios (UAM y F) se encuentran en reactores en lote con 1.3 L de medio mineral. Los reactores se alimentaron dos veces por semana con 2 mL de MTBE. El suministro de oxígeno se realizó a través de una bomba que permite el flujo de aire a través de una manguera de silicón permeable al oxígeno (Figura 5). Los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente.



Figura 5. Reactor en lote de 2 litros con biomasa suspendida y suministro de aire por manguera de silicón, a temperatura ambiente, alimentado con MTBE como única fuente de carbono y energía. Fotografía de Morales y Deshusses 1999.

6.4.2 MICROCOSMOS.

El inóculo para los experimentos se obtuvo de muestras de los reactores en lote que se mantuvieron en botellas de 2L marca pyrex con 400 mL de medio mineral y 100 μ L de MTBE eran incubados a 30°C y 130 rpm. Los experimentos se realizaron en microcosmos (Figura 6), botellas serológicas de 162 mL con 25 y 10 mL de medio mineral a pH 7 y cerradas con válvulas Mininert bajo condiciones aerobias. La concentración de proteína inicial fue de 100 mg/L. Los sistemas se incubaron a 30 °C y 130 rpm en una incubadora orbital ESEVE INO-650M.

Los sustratos alternos (S_{alt}) empleados a lo largo de los experimentos fueron: ISO, DEE, HIBA, ELEV, LAC y GLI. El MTBE, ISO y DEE empleados fueron marca J.T. Baker grado reactivo. El HIBA fue marca Aldrich, ELEV de Bioxon y el glicerol marca Merck. La concentración empleada para el MTBE fue de 120 mg/L y para los demás compuestos de 50 mg/L.

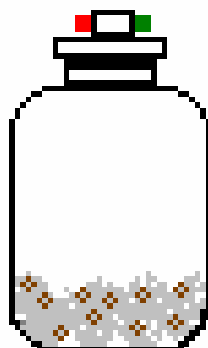


Figura 6. Botellas serológicas con válvulas mininert empleadas para llevar a cabo los microcosmos bajo condiciones controladas.

6.5 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA.

La biomasa fue cuantificada a través de la determinación de proteína por el método colorimétrico de Lowry comercial. (BIO-RAD DCTM Protein Assay).

Inicialmente la muestra fue macerada mediante un homogeneizador de vidrio de 7 mL, marca Pyrex (ya que los cultivos forman aglomerados). Posteriormente la solución se diluyó y se adicionó NaOH 0.6 N en una proporción 1:1 y se agitó vigorosamente. Los viales fueron calentados en agua a ebullición durante 20 minutos y posteriormente se siguieron los pasos del método colorimétrico de Lowry comercial. (BIO-RAD DCTM Protein Assay). Se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 750 nm en un espectrofotómetro UV/VIS Perkin Elmer Lambda 11.

6.5.1 CURVA PATRÓN DE PROTEÍNA.

Se realizó una curva patrón con albúmina bovina (Sigma Chemical Co.), en un rango de 50 a 250 mg_{proteína}/L. Las soluciones con diferentes concentraciones se prepararon con medio mineral, lo que nos permitió eliminar la interferencia de este medio. Posteriormente se siguió la misma técnica de BIO-RAD para su cuantificación.

6.5.2 PESO SECO.

Para obtener el peso seco, se realizaron diluciones 1:10 de las muestras de los consorcios. Se tomaron 5 mL de las diluciones y fueron depositados en papel filtro previamente ajustado a peso constante en la estufa a 100°C. Los papeles filtro con la muestra húmeda se colocaron en la estufa a 100°C durante 30 minutos. Posteriormente se colocaron en un desecador durante 5 minutos, para después ser pesados en la balanza analítica. Esta dinámica se repitió hasta alcanzar un peso constante.

Por otra parte se cuantificó la proteína de las mismas soluciones diluídas, mediante el método de Lowry. La relación entre el peso seco y la proteína permitió conocer el porcentaje de proteína presente en la muestra, el cual fue de 35%.

6.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

La determinación de MTBE se realizó mediante cromatografía de gases en un cromatógrafo HP 5890 series II, con una columna capilar HP624 de 30 m X 3.2mm X 1.8µm de espesor de película. Las temperaturas de operación fueron de 100, 200 y 220°C para el horno, inyector y detector, respectivamente. El gas acarreador fue nitrógeno con un flujo de 1.5 mL/min, el hidrógeno y aire tuvieron un flujo de 30 y 300 mL/min respectivamente. El cromatógrafo cuenta con un detector de ionización de flama (FID) y el volumen de muestra de inyección fue de 100 µL de fase gaseosa.

La determinación de CO₂ y O₂ se realizó en una sola muestra, mediante análisis por cromatografía de gases, con un cromatógrafo Gow-Mac serie 550 con una columna concéntrica CTR1 Alltech, (USA) para gases conectada a un detector de conductividad térmica. Las condiciones de operación fueron de 70°C para el inyector, 160°C para el detector y 50°C para la columna. El gas acarreador fue helio, con un flujo de 60 mL/min. El volumen de muestra inyectado fue de 150 µL (Anexo 2A).

El glicerol fue determinado mediante cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC), en un equipo Thermo Separation Products, con un detector de índice de refracción. Se usó una columna Alltech IOA-1000 para ácidos orgánicos y una fase móvil de H₂SO₄ 0.005 N y un flujo de 0.4 mL/min, a 70°C. El volumen de inyección fue de 20 µL.

6.6.1 CURVAS PATRÓN PARA MTBE Y COEFICIENTE DE PARTICIÓN.

Para poder cuantificar el consumo de MTBE se realizó una curva patrón. La curva se preparó en un rango de concentraciones de 15 a 300 mg MTBE/L. Estas concentraciones fueron empleadas tanto en fase gaseosa como en fase gas-líquido, en botellas serológicas de 162 mL con 10 mL de medio mineral, según el caso y sin inóculo. Del espacio vacío en las botellas se tomó un volumen de inyección de 100 µL que se inyectó en el cromatógrafo de gases bajo las condiciones mencionadas en métodos analíticos. Con las áreas y concentraciones de la primera fase se ajustó una línea recta para conocer las concentraciones de MTBE en el sistema gas-líquido. Las botellas con MTBE se mantuvieron a 30°C y 130 rpm durante 24 horas, en una incubadora orbital ESEVE INO-650M, para permitir el equilibrio de las fases. El coeficiente de partición se obtuvo de la pendiente entre las concentraciones de MTBE en fase gas y fase gas-líquido para un mismo sistema.

6.7 TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

6.7.1 SECADO AL PUNTO CRÍTICO.

Muestras de biomasa obtenida de los microcosmos se prepararon como se describe a continuación: volúmenes de 4 mL de los consorcios fueron centrifugados para obtener un aglomerado de aproximadamente 0.5 cm de diámetro. El aglomerado se resuspendió en glutaraldehído durante 24 horas para fijar las proteínas, posteriormente se lavó con amortiguador de fosfatos hasta eliminar el olor a glutaraldehído. A continuación se adicionó al aglomerado tetraóxido de osmio como fijador secundario, el cual nos permite fijar los lípidos y se mantuvo la mezcla durante 2 horas. Por último se realizaron dos lavados con acetona a diferentes porcentajes: 30, 40, 50, 70, 80 90, y 100% durante 15 minutos. Las muestras con acetona al 100% fueron depositadas en cámaras de desecación de papel Whatman 42.

Posteriormente las muestras se introdujeron en un desecador donde la acetona fue sustituida por CO₂ líquido para dejar las muestras secas y listas para observarse en el microscopio electrónico. El secado se realizó según la técnica reportada por Santander 1968 y Slöstrand 1967.

6.8 TÉCNICAS MOLECULARES.

6.8.1 EXTRACCIÓN DE ADN.

La extracción de ADN de las muestras se realizó con ayuda de un Kit de extracción de ADN para muestras de suelos (ULTRA CLEAN SOIL DNA KIT # CATALOGO 12800-50) siguiendo el procedimiento citado (Anexo 1).

6.8.2 AMPLIFICACIÓN AL AZAR DE ADN POLIMÓRFICO (RAPD)

El objetivo de esta técnica es el de aumentar el número de copias (amplificación) de un fragmento de interés, por medio una enzima Taq polimerasa. La amplificación se llevó a cabo en una cámara de electroforesis horizontal marca BIO-RAD modelo 300 (Figura 7).

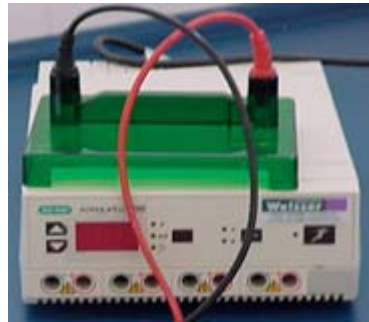


Figura 7. Cámara de electroforesis horizontal para la amplificación al azar polimórfica de ADN.

6.8.3 CONDICIONES DEL RAPD.

La técnica consiste en tres pasos sucesivos que componen un ciclo básico. El primer paso se lleva a cabo a 94°C durante 45 segundos, durante esta etapa se realiza la desnaturalización de la doble hélice de ADN debido a la ruptura de los puentes de hidrógeno como consecuencia de la temperatura elevada. En el segundo paso la temperatura disminuye a 45°C durante 45 segundos; durante esta etapa se realiza la hibridación de los cebadores con el ADN molde. El último paso es la elongación o síntesis de cadenas complementarias al ADN molde por acción de la polimerasa, proceso que es llevado a cabo a 72°C durante 90 segundos. Este ciclo básico se repitió 30 veces.

Una vez que el RAPD ha concluido, las muestras se corren en un gel de agarosa al 1% a 90 Volts, durante 1 hora. Posteriormente el ADN fue visualizado con Bromuro de Etidio durante 20 minutos y fotografiado con un analizador de imágenes de Bio-Rad.

La amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD) usa un solo cebador, de menor longitud que los acostumbrados, lo que favorece mayores posibilidades de hibridación y da como resultado un patrón de bandas similar a una huella digital (Wong y *col.*, 1996).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 EFECTO DE LOS SUSTRATOS ALTERNOS (S_{alt}) EN LA ETAPA DE ADAPTACIÓN PARA EL CONSUMO DE MTBE.

A lo largo del presente trabajo se evaluó la actividad de los consorcios F y UAM para el consumo de MTBE, así como el incremento en biomasa debido al uso de S_{alt} . En esta sección se presentan los resultados de la evaluación del efecto de los S_{alt} en el consumo de MTBE para el consorcio F.

7.1.1 PRIMERA ADICIÓN DE MTBE Y S_{alt} .

Inicialmente cuando se hicieron los primeros experimentos con el consorcio F, éste se encontraba en una etapa de recuperación de la actividad para la degradación de MTBE. Lo anterior se debió a que el consorcio acidificaba el medio debido al empleo de amonio como fuente de nitrógeno y el proceso de nitrificación. El consorcio tenía una semana de adaptación utilizando nitrato como fuente de nitrógeno. Los S_{alt} empleados simultáneamente al MTBE durante el experimento fueron ELEV, DEE, ISO, HIBA y LAC, fuentes de carbono que sólo se adicionaron durante el primer periodo de consumo de MTBE (etapa de stress). En la Figura 8 se muestran los tiempos de adaptación para el consumo de MTBE, que fueron desde 10 hasta 40 días, la presencia de los S_{alt} favoreció la disminución de los tiempos de adaptación en comparación con el control (sólo con MTBE).

Cuando empleamos MTBE como única fuente de carbono y energía, el periodo de adaptación fue de 40 días y el consumo de MTBE prosiguió durante 14 días más, siendo éste el periodo más largo para el inicio del consumo del MTBE presentado por todos los sistemas.

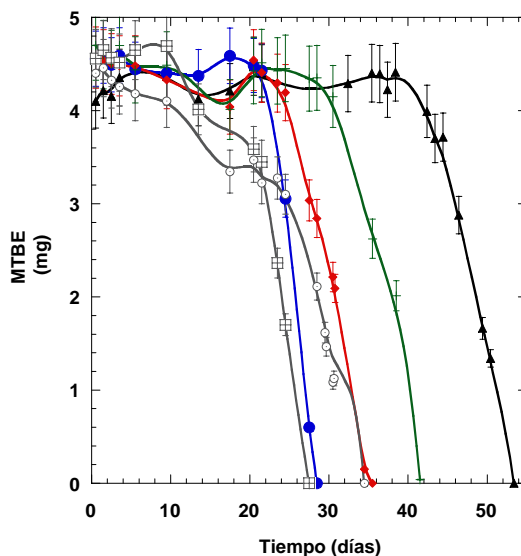


Figura 8. Periodo de adaptación para el inicio de la oxidación de MTBE en presencia de los S_{alt} , se empleó una concentración de 140 mgMTBE/L, 50 mg S_{alt} /L, 100 mg proteína/L y 25 mL de medio mineral. (▲) control, (▲) LAC, (○) ELEV, (◆) HIBA, (⊞) ISO, (●) DEE

En presencia de LAC y MTBE el periodo de adaptación fue de 30 días y el consumo de MTBE se llevó a cabo en 12 días más de forma constante. Steffan y col., 1997 reportaron que bacterias oxidadoras de propano capaces de consumir MTBE pueden crecer lentamente con LAC.

El sistema alimentado con ELEV y MTBE mostró un periodo de adaptación de 10 días; posteriormente se llevó a cabo el consumo de MTBE durante 8 días más. Sin embargo, después de este periodo se observó una segunda fase de adaptación que duró otros 10 días, a los cuales prosiguió el consumo de MTBE hasta eliminarlo completamente en 34 días. La presencia de ELEV favoreció la rápida activación de los microorganismos responsables del consumo de MTBE, ya que su periodo de adaptación fue de los más cortos, tal como se mencionó anteriormente; diferentes autores han evaluado el efecto del extracto de levadura para el incremento de biomasa en microorganismos capaces de eliminar MTBE (Hatzinger y col., 2001)

En presencia de HIBA y MTBE el tiempo de adaptación fue de 24 días y el MTBE se consumió en los siguientes 12 días. Steffan y col., 1997 estudiaron el efecto del

HIBA en bacterias oxidadoras de propano, que consumían MTBE. Observaron la acumulación de HIBA durante la degradación de MTBE, por lo que sugieren que la conversión del HIBA al siguiente metabolito podría ser un paso limitante regulado principalmente por dos reacciones, la deshidratación y la hidroxilación, que pueden desarrollarse por enzimas monooxigenasas P-450 (Figura 3). Los autores mencionan que la presencia de HIBA favorece la producción de enzimas de este tipo para la oxidación de MTBE.

Cuando empleamos ISO y MTBE el periodo de adaptación fue de 10 días, después de los cuales, el consumo de MTBE se llevó a cabo de forma constante hasta el día 28. Steffan y col., 1997 reportan que microorganismos propanotróficos capaces de consumir ISO pueden ser adicionados a acuíferos contaminados con MTBE, ya que éstos podrían estimular la degradación del contaminante. Pitre y Steffan y col., 1999 emplearon ISO para favorecer el crecimiento celular en biorreactores de membrana logrando alcanzar eficiencias de remoción de hasta 98% del MTBE.

Cuando se empleó DEE con MTBE el periodo de adaptación fue de 20 días, posteriormente el consumo de MTBE se llevó a cabo en 8 días más. Este S_{alt} fue empleado por Fortin y col., 2001 para incrementar la biomasa del consorcio F, sin embargo no observaron un incremento en la degradación de MTBE.

Como podemos observar, la presencia de los S_{alt} durante la etapa de stress en la que se encontraba el consorcio favoreció la disminución de la fase de adaptación, durante el consumo de MTBE.

7.1.2 SEGUNDA Y TERCER ADICIÓN DE MTBE.

Después de la primera adición, que correspondió al periodo de adaptación, se continuó con la alimentación de MTBE como única fuente de carbono y energía. A partir de la segunda adición de MTBE la concentración de biomasa inicial en cada microcosmo fue distinta debido al S_{alt} empleado en la primer adición. El consumo de MTBE se llevó a cabo sin periodo de adaptación, tal como lo han reportado

Fortin y col., 2001 quienes reportan tasas de consumo de hasta 18 mg MTBE/g peso seco/h. En la Figura 9 se muestra el consumo de MTBE durante la segunda y tercer adición para cada uno de los sistemas, así como la producción de CO₂.

A partir de la segunda adición el sistema que sólo fue alimentado con MTBE (Figura 9a) muestra el consumo de este compuesto en alrededor de 5 días, así como una producción de CO₂ que corresponde aproximadamente al 40% del carbono adicionado (lo que indica la probable acumulación de intermediarios durante la oxidación de MTBE). El sistema que inicialmente fue alimentado con LAC y MTBE (Figura 9b), durante la segunda y tercer adición presenta un tiempo de oxidación de alrededor de 5 días para el MTBE y una producción de CO₂ del 36%. La Figura 9c muestra la oxidación de MTBE en el sistema alimentado en un inicio con ELEV y MTBE. Después de la primera adición, la oxidación del contaminante se llevó a cabo en aproximadamente 8 días y no se observó periodo de adaptación, tal como lo reportan Hatzinger y col., 2001 con bacterias capaces de eliminar MTBE que fueron alimentadas con ELEV para el incremento de biomasa. En este sistema se obtuvo una recuperación de carbono como CO₂ del 64%. En el sistema alimentado inicialmente con HIBA (Figura 9d) se observa la oxidación de MTBE durante las adiciones 2 y 3, en donde los tiempos de consumo fueron de alrededor de 4 días y la recuperación de carbono como CO₂ fue del 40%. El sistema alimentado inicialmente con ISO (Figura 9e) mostró el mismo comportamiento tanto en los tiempos de consumo de MTBE como en la producción de CO₂. Por otra parte el sistema alimentado inicialmente con DEE (Figura 9f) durante la segunda y tercer adición muestra tiempos de consumo de MTBE de 4 y 3 días, respectivamente, así como un porcentaje de recuperación de carbono en CO₂ del 56%.

Los porcentajes de recuperación de carbono como CO₂ se encuentran dentro de los rangos reportados en la literatura siempre superiores al 40% (Fortin y Deshusses 1999a; Fiorenza y Rifai 2003).

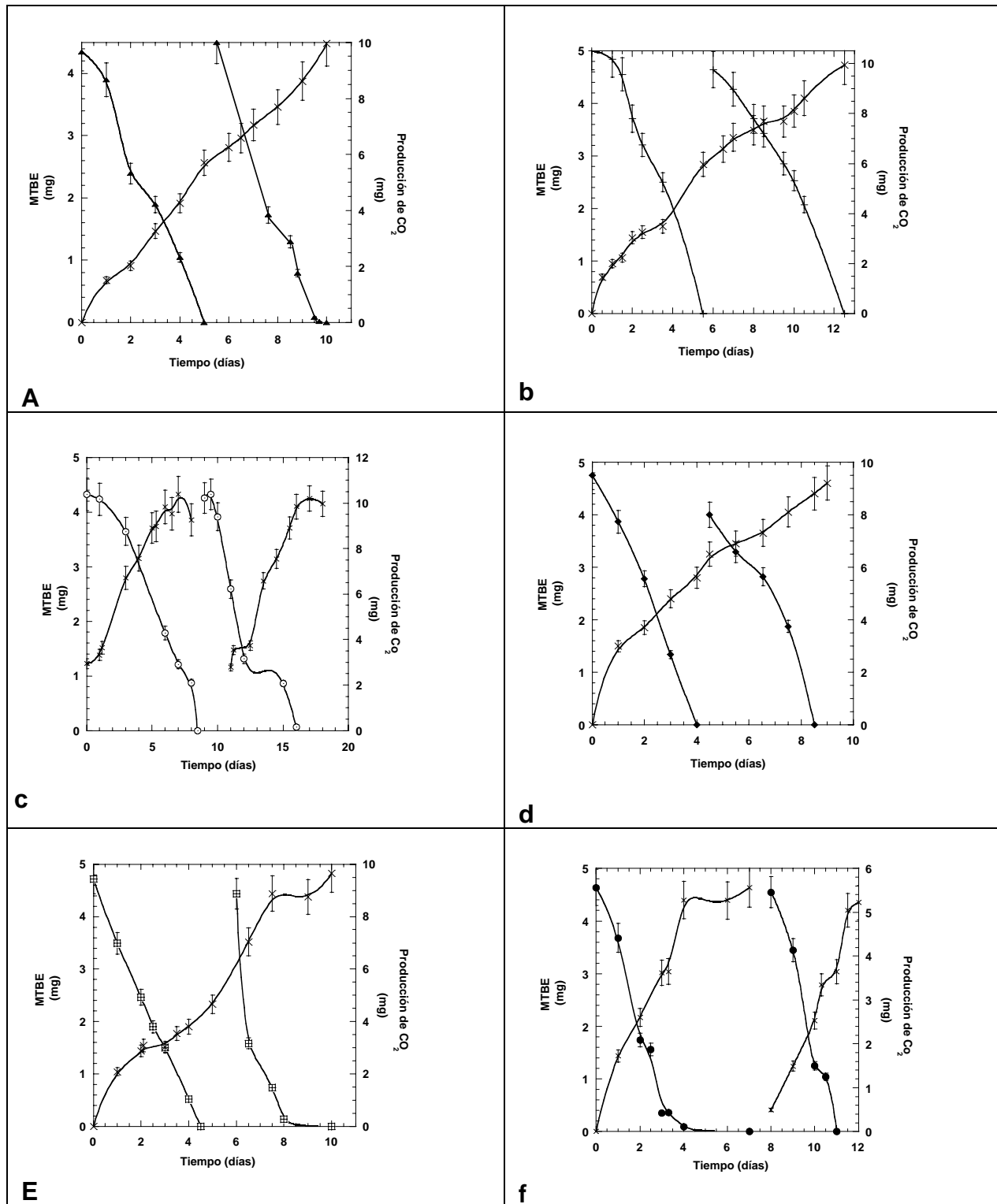


Figura 9. Eliminación de MTBE durante la segunda y tercer adición como única fuente de carbono y energía y producción de CO_2 (-x-). Los sistemas fueron inicialmente alimentados con MTBE y el siguiente S_{alt} ; a:(-▲-) MTBE, b:(-+-) LAC, c:(-○-) ELEV, d:(-◆-)HIBA, e:(-⊞-) ISO y f:(-●-) DEE

7.1.3 RENDIMIENTOS.

La biomasa se cuantificó indirectamente por medio de la proteína, al inicio y al final de los experimentos. El cálculo del incremento de biomasa se obtuvo considerando que el 35% de la biomasa es proteína. Este porcentaje fue obtenido experimentalmente por una relación de peso seco y proteína. El incremento de biomasa en cada adición de consumo de MTBE fue estimado por el rendimiento final obtenido y el MTBE adicionado en cada período.

Se obtuvieron los rendimientos de biomasa para cada uno de los sistemas, los cuales se muestran en la Tabla 2. Los rendimientos de biomasa fueron calculados para 3 adiciones de MTBE como única fuente de carbono y energía. Después del periodo de adaptación se cuantificó la biomasa en cada sistema con la finalidad de observar el aumento en la biomasa debido al S_{alt} . Posteriormente, se cuantificó al final de las 3 adiciones de consumo de MTBE.

Tabla 2. Rendimiento de biomasa-sustrato obtenido para 3 periodos de consumo de MTBE como única fuente de carbono y energía.

	Rendimientos Y x/s
MTBE (control)	0.12
LAC	---
ELEV	0.196
HIBA	0.092
ISO	0.452
DEE	0.330

Como se observa en la Tabla 2, los experimentos que incluyen al control sin aditivo, LAC, ELEV e HIBA fueron los sistemas que mostraron los rendimientos de biomasa más bajos. Estos rendimientos se encuentran dentro del rango reportado por autores como Salanito y col., 1994, Fortin y Deshusses 1999a, Fortin y col., 2001 y Fayolle y col., 2003 quienes emplearon el MTBE como única fuente de carbono y energía. Los sistemas alimentados con ISO y DEE mostraron los

rendimientos más altos durante esta etapa experimental. Estos rendimientos son similares a los reportados por Fortin y col., 2001 quienes usaron etanol, tolueno y DEE para el incremento en biomasa obteniendo rendimientos de hasta 0.6 g/g.

7.1.4 VELOCIDADES DE CONSUMO.

Las velocidades de consumo del MTBE en cada sistema se obtuvieron mediante el ajuste con el modelo matemático de Gompertz (Acuña y col., 1999, Anexo 2B) para las adiciones 2 y 3. Estas velocidades se hicieron específicas dividiéndolas entre la biomasa inicial estimada para cada adición de consumo. Las velocidades de consumo específicas de MTBE para el control fueron de 9.5 y 13.8 para las adiciones 2 y 3, respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Velocidades de consumo específicas para el consorcio F, durante los periodos en los cuales sólo se les adicionó MTBE como fuente de carbono y energía.

S_{alt} empleado	Velocidades de consumo específicas (mg MTBE/gX/h)	
	Adición 2	Adición 3
MTBE (control)	9.5	13.8
LAC	9.1	6.3
ELEV	7.3	7.6
HIBA	10.1	12.0
ISO	16.6	30.2
DEE	19.3	29.9

El sistema alimentado con LAC mostró una disminución en la velocidad de consumo específica para MTBE durante la tercer adición. Las velocidades obtenidas para el consorcio F alimentado con ELEV en el presente trabajo son similares en las dos adiciones. Estas velocidades fueron obtenidas con una concentración de MTBE de 140 mg/L. Hatzinger y col., 2001 reportan que la cepa ENV735 en presencia de ELEV alcanza velocidades de consumo específicas de 7.6 mg MTBE/g proteína /h, con bajas concentraciones de MTBE (25 mg/L). Cabe

resaltar que esta velocidad es mayor a la típica reportada para esta fuente de carbono. Para HIBA como S_{alt} , los valores de las velocidades de consumo obtenidas fueron similares a las del control, es decir no existe diferencia significativa entre ellas. Para los sistemas alimentados con ISO y DEE como S_{alt} durante el consumo de MTBE, las velocidades de consumo fueron el doble de las obtenidas para el sistema alimentado con MTBE como única fuente de carbono y energía. Fortin y col., 2001 reportan que el consorcio F presentó una actividad específica entre 7 y 18 mg MTBE/g peso seco/h y no observaron ningún incremento en la actividad cuando fue alimentado con DEE. Las velocidades reportadas por dichos autores para el consorcio F en presencia de DEE son menores a las obtenidas en el presente trabajo. Estas velocidades se encuentran dentro del rango reportado por Morales y col., 2003, es decir entre 0.92 y 44 mg MTBE/gX/h.

Cabe resaltar que en los sistemas que se obtuvo el mayor incremento en biomasa también se observó un incremento en las velocidades de consumo, lo que indica que tanto el ISO como el DEE pudieran ser S_{alt} que nos permitan favorecer a las poblaciones microbianas capaces de consumir MTBE.

Para los experimentos posteriores se seleccionaron tres de los S_{alt} empleados (ISO, DEE e HIBA) basándonos en el mantenimiento de las velocidades de consumo específicas, la reducción de los tiempos de adaptación y el incremento de los rendimientos de biomasa-sustrato. La siguiente parte experimental estuvo encaminada a evaluar las velocidades de consumo de MTBE en presencia de estos S_{alt} y el GLIC, el cuál fue incluido a partir de esta etapa experimental.

7.2 INFLUENCIA DE LOS S_{alt} EN LAS VELOCIDADES DE CONSUMO DE MTBE.

Durante estos experimentos se adicionaron los S_{alt} y el MTBE de forma simultánea en cada periodo de consumo. Se evaluó el consumo de MTBE en presencia de ISO, DEE, HIBA y GLIC, así como en el sistema control (sólo con MTBE). En el caso de DEE y GLIC fue posible evaluar su consumo en presencia de MTBE. En esta etapa se emplearon los dos consorcios F y UAM los cuales tenían cuatro meses de adaptación.

7.2.1 CONSORCIO F

En la Figura 10 se muestra el consumo de MTBE (control) obtenido por el ajuste del modelo matemático Gompertz sin adición de S_{alt} en 4 adiciones. El primer periodo de consumo de MTBE fue lento comparado con los siguientes tres, ya que existe una diferencia de hasta 10 horas. La disminución en los tiempos de consumo podría deberse a la aclimatación del consorcio. A lo largo de los 4 periodos de consumo no se observó adaptación para el consumo de MTBE, ya que éste fue consumido a lo largo del tiempo.

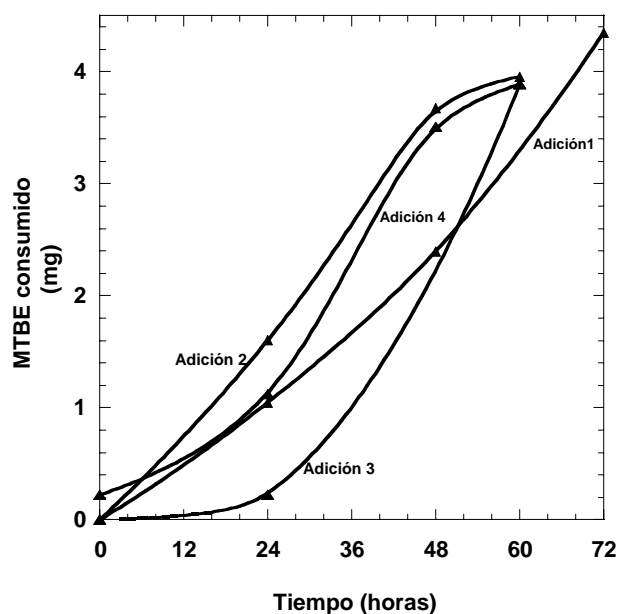


Figura 10. Control. Consumo de MTBE (-▲-) durante 4 adiciones ajustados por Gompertz (-■-).

En presencia de HIBA, el MTBE fue consumido a lo largo de cada periodo sin fase de adaptación (Figura 11). El tiempo de consumo de MTBE al comparar la primera adición con las siguientes tres disminuyó ya que pasó de 70 a 60 horas. Sin embargo, durante la última adición se observó una fase de retardo en cuanto al inicio del consumo de MTBE, esto podría indicar que el S_{alt} empleado no sólo favorece a las poblaciones responsables del consumo de MTBE.

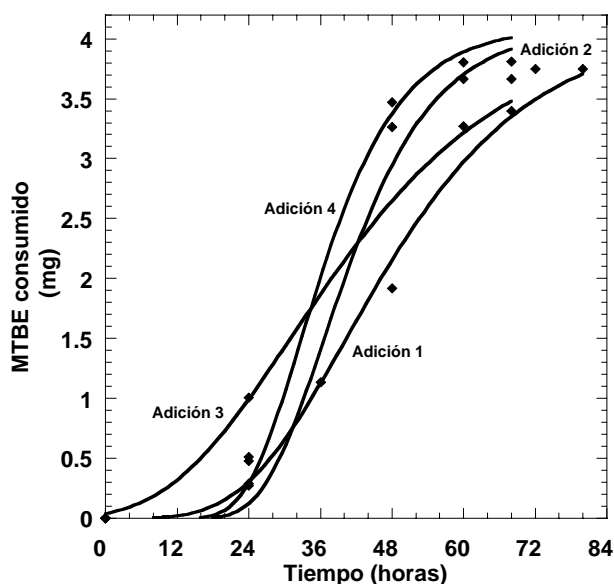


Figura 11. Consumo de MTBE en presencia de HIBA (-◆-) durante 4 ciclos de adición del contaminante ajustados por Gompertz (—).

En la Figura 12 se muestra el consumo de MTBE en presencia de ISO. Durante las primeras 24 horas no hubo consumo de MTBE lo que sugiere que durante este tiempo el S_{alt} fue consumido ya que el ISO no fue medido directamente por cromatografía. Después de este periodo el MTBE fue oxidado en las siguientes 50 horas. En este sistema no existió la disminución de los tiempos de consumo de MTBE a lo largo de las adiciones y fue el sistema que mostró los mayores tiempos de consumo para MTBE.

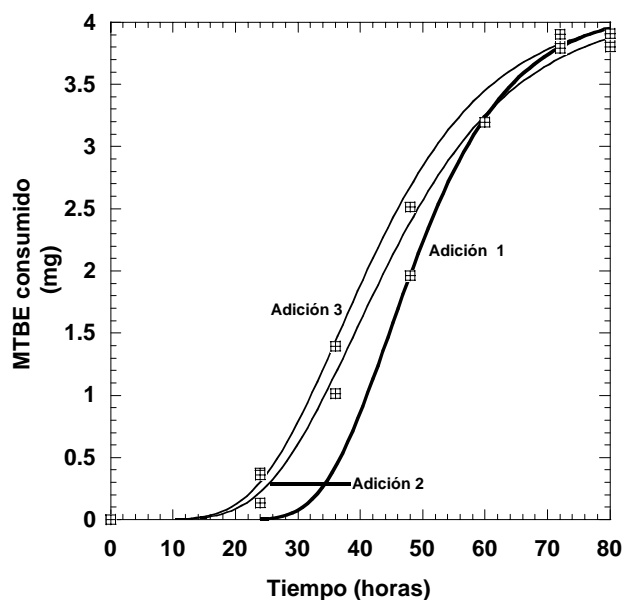


Figura 12. Consumo de MTBE en presencia de ISO (- \boxplus -) ajustado por Gompertz (- — -).

Para el sistema alimentado con DEE y MTBE se obtuvo un perfil similar en los consumos de MTBE (Anexo 5), sin embargo también se observó la oxidación completa del S_{alt} en las primeras 24 horas (Figura 13), mientras que el MTBE no fue consumido durante este periodo, por lo que se observa una fase de retardo, similar a lo reportado por Fortin y col., 2001, Dichos autores mencionan que para el mismo consorcio F el consumo de MTBE en presencia de DEE se llevó a cabo después de 4 días y sólo después de la completa eliminación del DEE. En la Figura 13 se muestra que durante este tiempo se producen 1.2 mg de CO_2 , correspondientes únicamente al consumo total de DEE (0.5 mg, tomando en cuenta la relación estequiométrica). En las siguientes 50 horas los 4 mg de MTBE (140 mg MTBE/L) fueron consumidos y se recuperó alrededor del 50% de carbono como CO_2 . Durante los 4 ciclos en presencia de DEE se observó el mismo tiempo de consumo de MTBE.

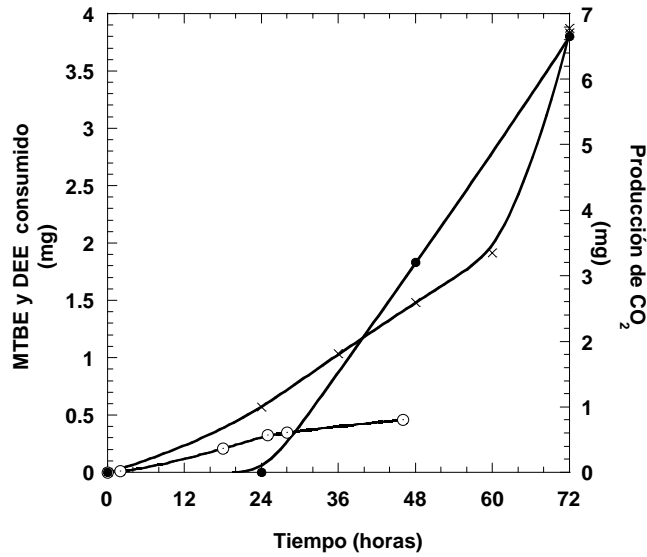


Figura 13. Consumo de MTBE en presencia de DEE (●) y DEE (○), así como la producción de CO₂ (-X-) durante el primer ciclo de consumo, ajustado por Gompertz (—).

En la Figura 14 se presentan los ajustes de la velocidad de consumo del MTBE en presencia de GLIC. Existe un incremento de la velocidad en cada adición, lo cual implica que el GLIC nos permite obtener biomasa activa para el consumo de MTBE. En este sistema se observa una disminución en los tiempos de consumo de MTBE entre la primera adición y las siguientes tres, de forma similar a lo observado en el sistema alimentado sólo con MTBE.

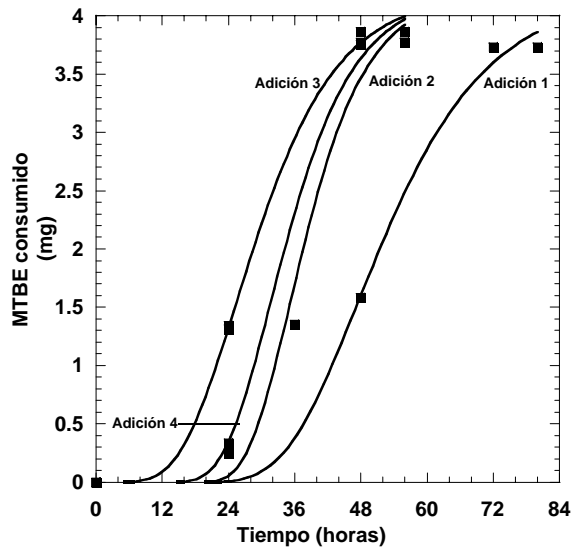


Figura 14. Consumo de MTBE en presencia de GLIC (■), ajustado por Gompertz (—).

7.2.1.1 RENDIMIENTOS

Por otra parte, se evaluó el incremento en la concentración de proteína obtenida después de 4 periodos de consumo de las dos fuentes de carbono y energía. Los valores de proteína permitieron estimar la biomasa, utilizando la relación biomasa-proteína obtenida experimentalmente mediante peso seco. Los rendimientos de biomasa obtenidos para cada uno de los sistemas se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Rendimientos de biomasa-sustrato obtenidos para el consorcio F durante cuatro periodos de consumo de MTBE y del S_{alt} .

S_{alt} + MTBE	Rendimientos Y x/s*
MTBE (control)	0.13
HIBA	0.26
ISO	0.19
DEE	0.30
GLIC	0.27

* se consideró el sustrato total adicionado.

Todos los S_{alt} empleados en cada una de las adiciones de MTBE favorecieron el incremento en biomasa. En presencia de HIBA, DEE y GLIC se obtuvo el doble de biomasa, en comparación con el sistema alimentado solo con MTBE. Comparado con el experimento anterior el ISO y DEE mostraron el mismo comportamiento en los rendimientos de biomasa ya que son superiores al control, por otra parte el empleo continuo de HIBA como S_{alt} en esta ocasión favoreció una mayor producción de biomasa contrario a lo observado en el experimento anterior cuando el HIBA fue adicionado solo en el primer periodo de consumo de MTBE.

En el presente trabajo, a lo largo de los dos experimentos realizados, los rendimientos de biomasa obtenidos en cada uno de los sistemas en presencia de los S_{alt} fueron superiores al control. Sin embargo, estos rendimientos están por debajo de los reportados en la literatura cuando se emplean sustratos como el

DEE, ya que como se mencionó anteriormente pueden llegar a ser de hasta 0.6 g/g.

7.2.1.2 VELOCIDADES DE CONSUMO.

Las velocidades obtenidas por el modelo Gompertz durante 4 periodos de consumo de MTBE en presencia de los S_{alt} se muestran en la Tabla 5. El sistema alimentado con MTBE como única fuente de carbono y energía en las últimas adiciones mantiene las velocidades de consumo, debido probablemente a los bajos rendimientos de biomasa obtenidos con este sustrato.

Tabla 5. Velocidades de consumo para MTBE en presencia del S_{alt} .

	(mg MTBE/hora)			
	Adiciones			
S_{alt} + MTBE	1	2	3	4
MTBE (control)	0.085	0.103	0.129	0.106
HIBA	0.087	0.122	0.074**	0.160
ISO	0.14	0.106	- **	0.113
DEE	0.10	0.080	- **	0.097
GLIC	0.117	0.200	0.152	0.180

** Ajuste de $r < 0.97$

Para el sistema alimentado con HIBA y MTBE se observa un incremento en las velocidades de consumo, a excepción de la tercera adición en donde la velocidad es menor y el ajuste de datos se encuentra por debajo del 97%. Para el sistema alimentado con ISO y MTBE no se observó un incremento en las velocidades de consumo máximas para MTBE; por el contrario éstas tendieron a disminuir. De igual forma, el sistema alimentado con DEE tiene una tendencia a disminuir las velocidades de consumo a lo largo de cada una de las adiciones. Sin embargo, el sistema alimentado con GLIC y MTBE mostró un incremento en las velocidades de consumo, además de ser superiores a las del control. Como se mencionó anteriormente todos los S_{alt} empleados favorecieron el incremento en biomasa, pero sólo el HIBA y GLIC incrementaron la velocidad de consumo de MTBE a lo

largo de cada adición, en forma similar a lo observado para el control. El incremento en la velocidad de consumo máxima podría indicar que las poblaciones responsables del consumo de MTBE se mantienen activas en presencia de estas fuentes de carbono. La presencia de DEE e ISO, aún cuando permitió un incremento en la biomasa disminuye la velocidad de consumo a lo largo de las adiciones. Es probable que el ISO y el DEE no beneficien a las poblaciones responsables del consumo de MTBE

Para una mejor comprensión de la actividad microbiana la velocidad obtenida por Gompertz se dividió entre la biomasa presente al inicio de cada adición. En la Tabla 6 se muestra la velocidad de consumo específica para las adiciones 1, 2 y 4, ya que estas cinéticas fueron las que se ajustaron con una $r > 0.97$.

Tabla 6. Velocidades de consumo de específicas para MTBE durante tres adiciones.

Velocidades de consumo específicas (mgMTBE/gX/h)				
Adición	1	2	4	C.V. (%)
MTBE (Control)	15.6	24.7	15.1	6.5
HIBA	12.5	17.5	14.2	5.0
ISO	20.4	13.4	11.6	7.5
DEE	14.4	8.8	7.8	7.0
GLIC	16.5	22.9	15.3	6.5

C.V. .coeficiente de variación en porcentaje

El HIBA presenta un comportamiento similar al control en las velocidades de consumo específicas pero con valores menores que el control. La presencia de ISO y DEE provocó la disminución de las velocidades, lo que indica que se incrementaron las poblaciones microbianas no responsables del consumo de MTBE o se provocó un desbalance en las poblaciones. El sistema que presentó un comportamiento similar al del control en las velocidades de consumo específicas fue el alimentado con GLIC tal como lo muestra el análisis de varianza en el Anexo 10.

Se obtuvieron, en general, menores velocidades específicas de consumo de MTBE, en presencia de DEE e ISO y éstas tendieron a decrecer a lo largo de las adiciones, indicando que: a) se favoreció la presencia de poblaciones que no

degradan MTBE, b) los S_{alt} fueron asimilados preferencialmente, lo cuál ocasionó la pérdida de la capacidad de degradar MTBE o bien hubo una competencia por sustratos. Con HIBA las velocidades específicas fueron menores comparadas con las obtenidas en el sistema alimentado con GLIC, sin embargo en ambos sistemas las velocidades específicas tendieron a mantenerse. En lo que se refiere a la biomasa, tanto GLIC como HIBA la duplicaron pero sólo el GLIC mantuvo las velocidades de consumo específicas en comparación con el control.

7.2.1.3 BALANCE DE CARBONO

Se realizaron los balances de carbono para cada uno de los sistemas, considerando todo el sustrato adicionado y se observó que el porcentaje de recuperación de carbono considerando la biomasa y el CO_2 estuvo entre el 66.5 y el 85 % como se puede observar en la Tabla 7.

Tabla 7. Porcentajes de recuperación de carbono como biomasa y CO_2 para el consorcio F.

	Recuperación de carbono		
	% CO_2	% Biomasa (X)	C.V (%)
MTBE (control)	52.7	13.8	8
HIBA	56.4	28.8	7
ISO	57.4	19.9	7.5
DEE	52.6	30.8	9
GLIC	52.9	30.1	8

C.V = coeficiente de variación en porcentaje.

La razón por la que no se recuperó el 100% de carbono podría deberse a la acumulación de un intermediario, como es el caso del TBA. El TBA ha sido reportado por diversos autores como el principal intermediario de la ruta de degradación de MTBE y se ha observado su acumulación en una relación estequiométrica con el MTBE (Hatzinger y col., 2001).

7.2.2 CONSORCIO UAM

El consorcio UAM fue evaluado bajo las mismas condiciones que el consorcio F. Los S_{alt} empleados fueron; GLIC, ISO, HIBA y DEE los cuales fueron adicionados de forma simultánea con el MTBE durante cuatro periodos de consumo.

7.2.2.1 RENDIMIENTOS

Después de cuatro periodos de consumo de MTBE en presencia de los S_{alt} se evaluó el incremento de biomasa en cada uno de los sistemas. Los rendimientos de biomasa-sustrato, calculados para las dos fuentes de carbono durante las 4 adiciones se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Rendimientos de biomasa-sustrato para el consorcio UAM.

Salt + MTBE	Rendimiento Y x/s*
MTBE (control)	0.12
HIBA	0.26
ISO	0.18
DEE	0.29
GLIC	0.27

*Se consideró todo el sustrato adicionado.

En la Tabla 8 se observa que todos los S_{alt} empleados favorecen el incremento de la biomasa. Sin embargo, sólo en presencia de HIBA, DEE y GLIC se obtuvo el doble de biomasa comparado con el sistema control. El incremento en biomasa fue estimado mediante la relación de peso seco considerando que el 35% de biomasa es proteína tal como se mencionó anteriormente.

7.2.2.2 VELOCIDADES DE CONSUMO

En la Figura 15 se muestra el consumo de MTBE en presencia de GLIC durante cuatro adiciones de MTBE. Podemos observar el ajuste de los consumos de MTBE obtenidos por Gompertz.

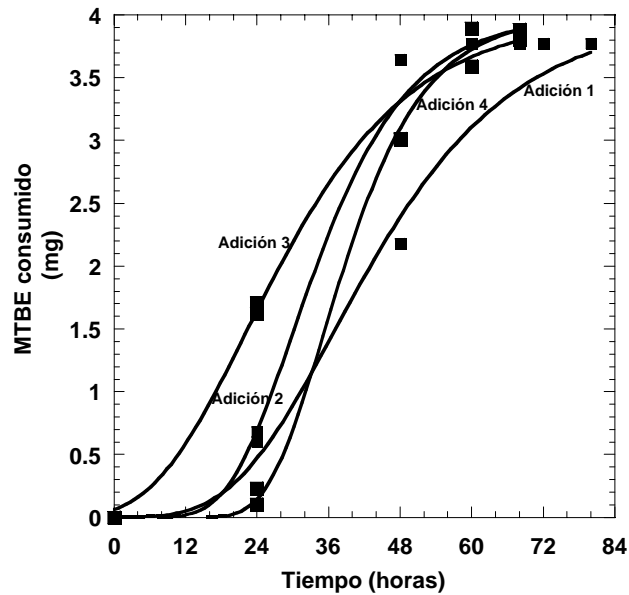


Figura 15. Consumo de MTBE en presencia de GLIC (-■-) durante 4 adiciones simultáneas ajuste por Gompertz (-).

El sistema alimentado con GLIC mostró una disminución de los tiempos de consumo entre la primera adición y las siguientes tres, lo que confirma que el GLIC no afecta las poblaciones responsables del consumo de MTBE. Aún cuando en el último periodo de consumo de MTBE se observa una fase de adaptación, el tiempo final de consumo de MTBE es el mismo que los anteriores por lo que sugerimos que podría deberse a un error experimental en ese punto de muestreo.

Los consumos de MTBE en presencia de cada uno de los S_{alt} fueron ajustados por el modelo Gompertz para obtener la velocidad de consumo en cada una de las adiciones y serán mostrados posteriormente. La Figura 16 muestra la evolución del MTBE ajustado por Gompertz en la segunda adición, para todos los sustratos alternos empleados.

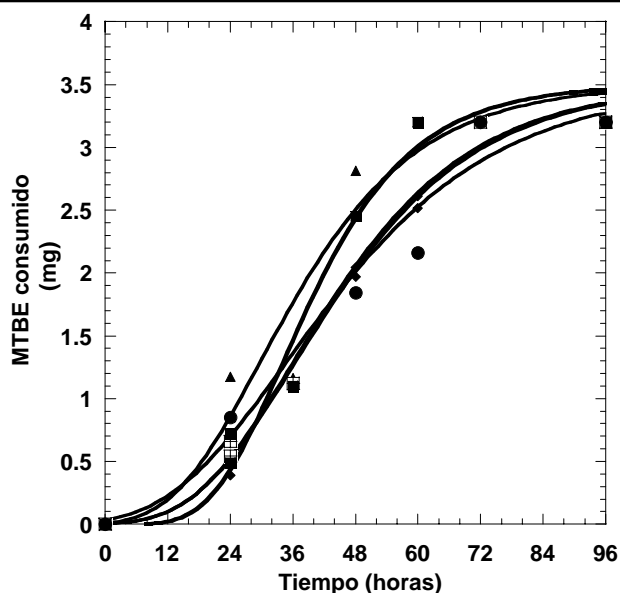


Figura 16. Consumo de MTBE para los sistemas alimentados con DEE (●), HIBA (◆), ISO (▣) y GLIC (■) durante el segundo ciclo de adición, ajustados por Gompertz (—).

Los sistemas alimentados con ISO y DEE no presentaron una disminución en los tiempos de consumo. En presencia de DEE se observó que existe un periodo de retardo para el consumo de MTBE de alrededor de 24 horas, tiempo durante el cual el DEE es oxidado, tal como se observó también para el consorcio F.

Durante la primera adición se observó el mismo tiempo de consumo de MTBE en cada uno de los sistemas (72 horas). En los sistemas alimentados con GLIC e HIBA como S_{alt} se pudo observar que a partir de la segunda adición, el tiempo de consumo disminuyó a 60 horas; este tiempo fue constante a lo largo de las adiciones posteriores.

En la Tabla 9 las velocidades de consumo específicas corresponden a las adiciones 1, 2 y 4, la tercera adición no se muestra debido a que su ajuste mostró un r menor a 0.97. Durante el primer periodo, todos los sistemas presentaron la misma velocidad de consumo para el MTBE. Al comparar estadísticamente las velocidades obtenidas para los sistemas alimentados con HIBA, ISO y GLIC, frente al control durante este periodo, no se encontraron diferencias significativas, lo que indica que hasta el momento estos S_{alt} no modificaron las poblaciones responsables del consumo de MTBE (como se observó en el caso del DEE, donde

durante el segundo periodo el sistema alimentado con DEE disminuyó su velocidad a 10 mg MTBE/gX/h en comparación con el control que presentó una velocidad de 15 mg MTBE/gX/h). Se observó que el sistema alimentado con GLIC y MTBE mantiene el comportamiento de las velocidades de consumo específicas a lo largo de las adiciones, comparado con el control, siendo en algunos casos las velocidades superiores a las del control. Esto nos muestra que este S_{alt} no tiene un efecto negativo sobre las poblaciones responsables del consumo de MTBE.

Tabla 9. Velocidades de consumo específicas para MTBE durante tres periodos de consumo de MTBE.

Velocidades de consumo específicas (mgMTBE/gX/h)				
	Número de adición			
	1	2	4	C.V. (%)
MTBE (control)	13.9	15.8	11.9	7.5
HIBA	14.2	14.5	8.3	7.3
ISO	13.8	14.2	9.0	6.0
DEE	13.8	10.7	10.9	6.5
GLIC	12.8	16.4	13.8	7.0

C.V coeficiente de variación en porcentaje.

Finalmente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para comparar las velocidades de consumo específicas de cada uno de los consorcios (el F y el UAM) con cada uno de los sustratos empleados. La comparación estadística nos muestra que no existe diferencia significativa entre las velocidades de consumo, debido a la diferencia de valores entre adiciones o periodos de consumo (Anexo 11). Sin embargo se puede apreciar que en presencia de GLIC se obtienen las mayores velocidades de consumo.

7.2.2.3 BALANCE DE CARBONO

Se evaluó el porcentaje de carbono que se recuperó como biomasa y como CO_2 para los sistemas del consorcio UAM. La Tabla 10 muestra los porcentajes de recuperación para cada sistema, el total de carbono recuperado esta entre el 68.6 y el 84.5%.

Tabla 10. Porcentaje de recuperación de carbono en biomasa y CO₂.

Consortio UAM	Recuperación de carbono		C.V (%)
	% CO ₂	% Biomasa	
MTBE (control)	54.3	14.3	9
HIBA	55.9	28.6	6
ISO	54.9	19.1	6.5
DEE	50.6	30.4	8
GLIC	52.8	29.9	7.5

El balance se realizó considerando todo el sustrato adicionado. C.V coeficiente de variación en porcentaje.

Al igual que en el caso del consorcio F el porcentaje de recuperación de carbono fue alrededor del 80%, lo que implica que existe la posibilidad de que el TBA se esté acumulando en el sistema (como ha sido reportado en la literatura).

La presencia de GLIC e HIBA para este consorcio promovió la disminución de los tiempos de consumo de MTBE a lo largo del tiempo. El DEE, HIBA y el GLIC favorecieron el incremento en biomasa pero sólo el GLIC permitió mantener las velocidades de consumo específicas de MTBE. Con el experimento anterior pudimos concluir que no todos los S_{alt} empleados mantienen las velocidades de consumo específicas para el MTBE, al ser adicionados de forma simultánea y consecutiva. En la siguiente parte experimental se pretende observar el efecto de los S_{alt} durante la generación de un inóculo y posteriormente evaluar su capacidad para el consumo de MTBE.

7.3 CAPACIDAD DE LA BIOMASA CRECIDA EN LOS S_{alt} PARA CONSUMIR MTBE.

Los experimentos previos mostraron que algunos S_{alt} pueden favorecer poblaciones que no consumen MTBE. Por lo anterior, se evaluó la adición de los S_{alt} sólo en la etapa inicial buscando incrementar solamente la generación inicial de biomasa, tal como se hizo en la sección 7.1. Durante este experimento se adicionaron los S_{alt} y el MTBE de forma simultánea durante dos periodos (a y b) y en cinco (1-5) periodos posteriores sólo se adicionó MTBE como única fuente de carbono y energía. Durante estos últimos cinco periodos se evaluó la velocidad de

consumo específica para MTBE en los sistemas alimentados con los S_{alt} y en el control (sólo con MTBE) Para este experimento se emplearon ambos consorcios los cuales ya tenían siete meses de adaptación.

7.3.1 CONSORCIO F

En este experimento se decidió disminuir el volumen de medio mineral de 25 a 10 mL para tener una mayor cantidad de oxígeno en el sistema y por lo tanto favorecer la oxidación del MTBE.

7.3.1.1 RENDIMIENTOS

Después de siete adiciones de MTBE y dos de los S_{alt} los rendimientos de biomasa obtenidos para cada sistema fueron los siguientes:

Tabla 11. Rendimientos de biomasa-sustrato para el consorcio F.

	Rendimiento Yx/s*
MTBE (control)	0.3
HIBA	0.39
ISO	0.32
DEE	0.43
GLIC	0.34

*Se consideró todo el sustrato adicionado a los sistemas, 7 ciclos de adición de MTBE y 2 de S_{alt} .

Como se puede observar en la Tabla 11, todos los S_{alt} empleados favorecieron una mayor producción de biomasa en los sistemas. El HIBA y DEE presentan los mayores incrementos en biomasa comparados con el control. El sistema alimentado con GLIC no presentó un incremento significativo en la biomasa. Mediante un análisis de varianza se demostró que no existe diferencia significativa entre los rendimientos obtenidos, debido a que el S_{alt} sólo fue empleado inicialmente para favorecer una mayor cantidad de inóculo.

La biomasa estimada para calcular las velocidades específicas se obtuvo a partir de los $Y_{x/s}$. Los rendimientos de biomasa obtenidos experimentalmente para el GLIC, ISO, HIBA y DEE fueron de 0.6, 0.4, 0.3 y 0.6 gX/gS, respectivamente para cada S_{alt} como única fuente de carbono y energía. Estos rendimientos se consideraron en la estimación de la biomasa inicial para el primer periodo en el que sólo se adicionó MTBE.

7.3.1.2 VELOCIDADES DE CONSUMO

Se obtuvieron las velocidades de consumo de MTBE para cada ciclo mediante el ajuste por Gompertz. En la Figura 17 se muestran las curvas de consumo del MTBE durante el quinto ciclo con los S_{alt} evaluados.

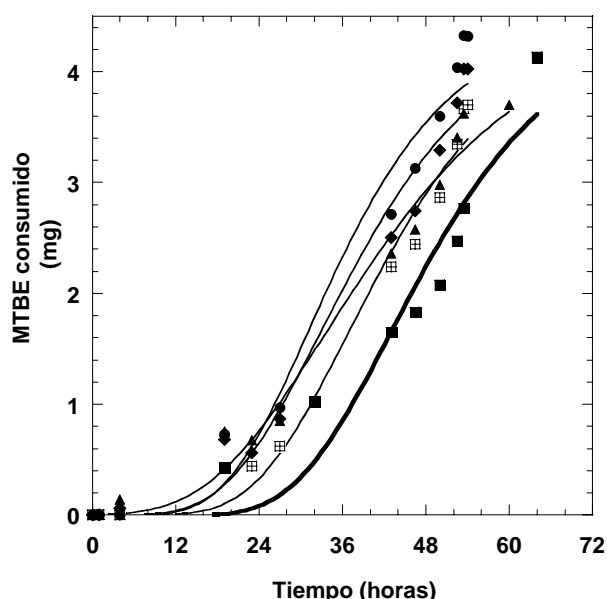


Figura 17. Consumo de MTBE (-▲-) durante la quinta adición de MTBE, después de ser alimentados por dos ocasiones con las dos fuentes de carbono. DEE (-●-), HIBA (-◆-) ISO (-▣-) y GLIC (-■-) ajustados por Gompertz (-).

Los tiempos de consumo para MTBE fueron similares en los sistemas alimentados con MTBE, HIBA, DEE e ISO, de alrededor de 60 horas. Sólo en el caso del GLIC se pudo observar que los tiempos de consumo para MTBE disminuyeron hasta las 46 horas, como lo muestra la Figura 18. El sistema alimentado inicialmente con GLIC presentó la mayor tasa de consumo de MTBE.

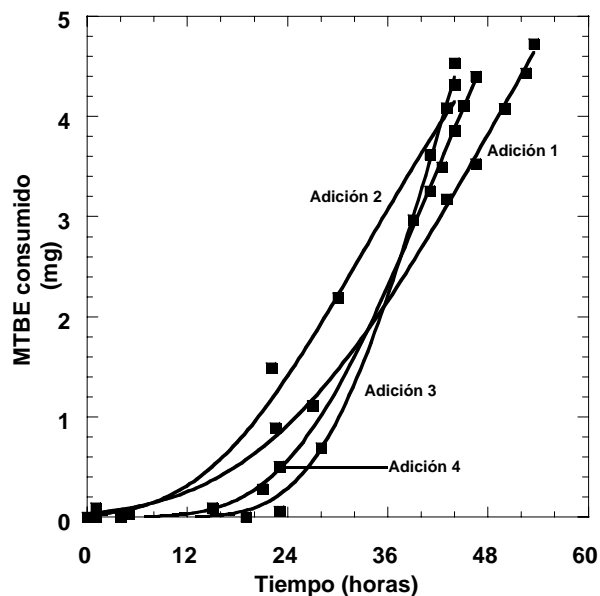


Figura 18. Consumo de MTBE en sistema alimentado con GLIC (■) como S_{alt} . Ajustado por Gompertz (—).

El sistema alimentado con GLIC mostró el mismo perfil que el control e incluso superó sus velocidades, esto podría indicar que el empleo de GLIC por dos periodos favoreció la activación enzimática para el consumo de MTBE.

Las velocidades de consumo obtenidas para este sistema muestran un incremento durante los primeros tres ciclos posteriormente se mantienen (Tabla 12). El cuarto periodo no se reporta por presentar un ajuste con r menor a 0.97. Durante los ciclos marcados del 1 al 5 se adicionó MTBE como única fuente de carbono y energía a los sistemas.

Tabla 12. Velocidades de consumo específicas para el consorcio F.

Adiciones	Velocidades específicas (mg MTBE/gX/h)			
	1	2	3	5
MTBE (control)	18.18	24.73	34.74	22.27
HIBA	17.81	16.52	19.78	12.21
ISO	8.38	11.83	8.38	---
DEE	11.72	16.31	22.79	13.12
GLIC	19.76	30.44	31.04	31.74

En todos los ciclos presentados se observa que el control y el sistema alimentado con GLIC muestran las mayores velocidades de consumo específicas. El sistema alimentado con GLIC, además de presentar el mismo perfil que el control durante los tres primeros ciclos, incrementa de forma significativa la velocidad en el quinto ciclo comparado con el control (nivel de significancia de 0.05). Los sistemas alimentados con HIBA y DEE presentan un incremento en las velocidades de consumo hasta el tercer ciclo, posteriormente las velocidades decrecieron y fueron inferiores a las del control. El sistema alimentado con ISO presentó las velocidades más bajas de todos los sistemas. Los decrementos en la velocidad de consumo pudieron deberse a que la biomasa generada por los S_{alt} mencionados no tiene la capacidad de continuar consumiendo MTBE.

7.3.1.3 BALANCE DE CARBONO.

En la recuperación de carbono como biomasa y CO_2 se consideró todo el sustrato adicionado en cada uno de los sistemas experimentales, se obtuvieron porcentajes de carbono total recuperado superiores al 90% (Tabla 13). A diferencia de los experimentos anteriores se obtuvo una mayor recuperación de carbono como CO_2 , debido a que los sistemas fueron dejados sin abrirse durante 48 horas más sin abrirse después del consumo total del MTBE.

Tabla 13. Recuperación de carbono como biomasa y CO₂ para el consorcio F.

	Recuperación de carbono		C.V (%)
	% CO ₂	% Biomasa (X)	
MTBE (control)	71.7	45.3	8.5
HIBA	69.4	42.6	7.0
ISO	55.6	39.5	7.5
DEE	69.7	49.2	8.0
GLIC	57.7	53.7	8.0

El balance se realizó considerando todo el sustrato adicionado. C.V coeficiente de variación en porcentaje.

Los mayores porcentajes de recuperación de carbono como CO₂, indican que existe la acumulación temporal de un intermediario durante el consumo de MTBE o la asimilación de la fuente de carbono es lenta. Ya que es necesario dejar los sistemas por más de 48 horas para obtener una producción constante de CO₂.

7.3.2 CONSORCIO UAM

Para el consorcio UAM se realizó la evaluación de la adición simultánea de las dos fuentes de carbono sólo inicialmente. Se obtuvieron los rendimientos de biomasa para cada S_{alt} como única fuente de carbono y energía y estos rendimientos fueron considerados para estimar la biomasa inicial en la primera adición de MTBE.

7.3.2.1 RENDIMIENTOS

Se evaluó el incremento en la concentración de proteína para calcular los rendimientos de biomasa-sustrato en cada uno de los sistemas. Se consideraron las dos adiciones de los S_{alt} y las 7 adiciones de MTBE. Los rendimientos se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Rendimientos de biomasa sustrato para el consorcio UAM.

	Rendimiento Yx/s
MTBE (control)	0.12
HIBA	0.17
ISO	0.20
DEE	0.18
GLIC	0.14

Se consideró todo el sustrato adicionado. Con un coeficiente de variación menor al 10%.

Los sistemas en los que se incrementaron los rendimientos de biomasa fueron los alimentados con ISO, HIBA y DEE, sin embargo los incrementos en biomasa no son de la misma magnitud que los observados en experimentos anteriores cuando el S_{alt} fue empleado a lo largo de cada una de las adiciones de MTBE. Probablemente no toda la biomasa generada inicialmente con el S_{alt} pudo mantenerse solo con MTBE.

7.3.2.2 VELOCIDADES DE CONSUMO

En la Tabla 15 se muestran las velocidades de consumo específicas para MTBE como única fuente de carbono y energía durante las adiciones 1, 2, 3 y 5. Las velocidades se incrementan y posteriormente se mantienen a lo largo de los periodos evaluados. El sistema alimentado con HIBA presenta en promedio una velocidad de 12 mg MTBE/gX/h en todas las adiciones, pero estos valores están por debajo de los del control.

Tabla 15. Velocidades de consumo específicas para el consorcio UAM.

Adición	Velocidad de consumo específica (mg MTBE/gX/h)			
	1	2	3	5
MTBE (control)	11.85	14.92	20.09	17.05
HIBA	11.84	10.79	16.80	10.67
ISO	11.5	9.45	7.45	ND
DEE	ND	12.71	16.21	ND
GLIC	12.12	14.29	20.79	20

ND= no determinada

En el caso del ISO se observa que las velocidades de consumo disminuyen a lo largo de los periodos desde 11 hasta 7 mg MTBE/gX/h, lo que puede indicar una inhibición en la actividad debido a la degradación de un sustrato de más fácil asimilación. En el sistema alimentado con DEE sólo se pudieron ajustar los consumos de MTBE de los periodos 2 y 3, estos nos muestran un incremento en las velocidades pero con valores por debajo del control.

El sistema alimentado con GLIC presenta un incremento en las velocidades de consumo de MTBE durante las tres primeras adiciones, alcanzando velocidades de hasta 20 mg MTBE/gX/h y posteriormente esta velocidad se mantuvo. Un perfil similar fue observado con el control, ya que este sistema también alcanzó velocidades de hasta 20 mg MTBE/gX/h.

Como se mencionó anteriormente los sistemas que incrementaron la biomasa fueron los alimentados inicialmente con HIBA, ISO y DEE, sin embargo estos sistemas no mantuvieron las velocidades de consumo a lo largo de las adiciones. Aunque la presencia de GLIC no muestra una diferencia significativa en los rendimientos de biomasa comparado con el control, las velocidades de consumo se incrementaron a lo largo de las cinco adiciones.

7.3.2.3 BALANCE DE CARBONO

En el balance de recuperación de carbono mostrado en la Tabla 16 observamos que en la mayoría de los sistemas se obtuvo alrededor del 80% de recuperación de carbono en biomasa y CO₂.

Tabla 16. Porcentaje de recuperación de carbono, como biomasa y CO₂.

Recuperación de carbono			
Consorcio UAM			
S_{alt} adicionado	% CO₂	% Biomasa	C.V (%)
MTBE (control)	54.3	18.2	7.2
HIBA	55.9	27.3	6.5
ISO	54.9	29.9	6
DEE	50.6	27.2	7
GLIC	56.7	24.8	5.5

El balance se realizó considerando la adición total de las fuentes de carbono empleadas. Coeficiente de variación (C.V) en porcentaje.

No fue posible obtener el 100% de recuperación de carbono, aún cuando se dejaron los sistemas 48 horas para obtener la mayor cantidad de CO₂ posible. La recuperación de carbono como biomasa fue menor en comparación con el consorcio F ya que con este consorcio en la mayoría de los sistemas se obtuvo más del 40% de carbono como biomasa. Los rendimientos de biomasa obtenidos para el consorcio UAM coinciden con los rendimientos reportados por diversos autores, en el rango de 0.09 a 0.2 g X/g MTBE. (Salanitro y col., 1994; Steffan y col., 1997; Deeb y col., 2000; Fortin y col., 2001). También existe la probabilidad de que algún intermediario se acumule durante la oxidación del MTBE, tal como el TBA (Hatzinger y col., 2001, Fortin y col., 2001)

Durante este experimento no se encontraron diferencias significativas entre los rendimientos de biomasa en ambos consorcios, lo que podría deberse a que los S_{alt} fueron empleados sólo durante dos adiciones y el incremento en biomasa solo se realizó en la etapa inicial. Con los experimentos anteriores se llegó a la

conclusión de que el GLIC fue el S_{alt} que permite incrementar las poblaciones microbianas responsables del consumo de MTBE tanto en el consorcio F como en el UAM, ya que incrementa la biomasa y permite el mantenimiento de las velocidades de consumo específicas para MTBE.

7.4 EFECTO DEL GLICEROL EN EL CONSUMO DE MTBE.

Los resultados mostraron que entre los sustratos evaluados (DEE, ISO, HIBA y GLIC) el GLIC fue la fuente de carbono alterna que nos permitió incrementar la población microbiana capaz de consumir MTBE. Los siguientes experimentos se realizaron con el fin de evaluar con mayor detalle el efecto del GLIC sobre la velocidad de consumo específica del MTBE y los rendimientos de biomasa en cada consorcio (F y UAM) en esta etapa el consorcio UAM tenía diez meses de adaptación y el F sólo un mes ya que debido a la pérdida inóculo del consorcio F fue necesario obtener nueva biomasa para inóculo.

7.4.1 RENDIMIENTOS

Los rendimientos de biomasa (Y_x/s) obtenidos para los consorcios en presencia y ausencia de GLIC, se muestran a continuación:

Tabla 17. Rendimientos de biomasa obtenidos para el consorcio F y UAM durante 4 adiciones de MTBE y MTBE más GLIC como sustrato alterno.

Consorcio F	Rendimientos (Y_x/s)	C.V (%)
MTBE (control)	0.22	9.0
MTBE + GLIC	0.69	9.8
Consorcio UAM		
MTBE (control)	0.10	5.7
MTBE + GLIC	0.35	8.8

De la misma forma que en experimentos anteriores podemos observar que los sistemas alimentados con GLIC muestran los mayores rendimientos de biomasa en ambos consorcios. Sólo el consorcio F en presencia de GLIC y MTBE alcanzó los máximos rendimientos de biomasa tal como los reportados por Fortin y col., 2001 de hasta 0.6 g/g cuando emplearon diversos sustratos como fuentes de carbono alterna al MTBE.

7.4.2 VELOCIDADES DE CONSUMO.

Se evaluó el consumo de MTBE en presencia y ausencia de GLIC. La adición de MTBE y MTBE más GLIC se realizó durante los periodos 2, 3 y 4. Se obtuvieron las velocidades de consumo de MTBE mediante el modelo Gompertz. En la Figura 19, se muestran los consumos de MTBE para tres adiciones de MTBE y MTBE más GLIC. En la segunda adición la curva de consumo de MTBE en presencia de glicerol presenta la mayor pendiente comparada con el sistema que sólo se alimentó con MTBE. Para las adiciones 3 y 4 se observa que la pendiente de consumo de MTBE en presencia y ausencia de glicerol es similar a la del control (Anexo 6).

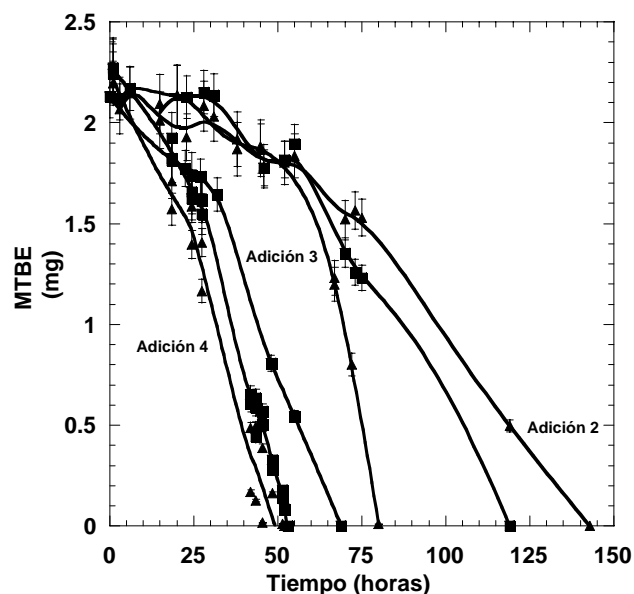


Figura 19. Se muestra la disminución de los tiempos de consumo para MTBE como única fuente de carbono y energía (-▲-) y para MTBE en presencia de GLIC (-■-).

Se puede observar que en ambos sistemas (MTBE y MTBE más GLIC) los tiempos de consumo de MTBE se reducen a lo largo del tiempo con respecto a las adiciones. Durante los periodos 2 y 3 los tiempos de consumo de MTBE en presencia de GLIC fueron menores, comparados con los sistemas que solo fueron alimentados con MTBE. Sin embargo, en la cuarta adición el tiempo de consumo de MTBE fue similar en ambos sistemas. Este último comportamiento nos indica

que la adición de GLIC es útil únicamente durante los primeras adiciones, ya que no favorece exclusivamente la biomasa responsable del consumo de MTBE. Para el consorcio UAM también fue posible observar este comportamiento. (Anexo 7)

En la Figura 20 también se muestran los ajustes de las velocidades de consumo de MTBE durante los ciclos evaluados. En la segunda adición el consumo de MTBE en presencia de GLIC presenta mayor velocidad, en comparación con el sistema que sólo se alimentó con MTBE. En las adiciones 3 y 4 el consumo de MTBE es similar en ambos sistemas.

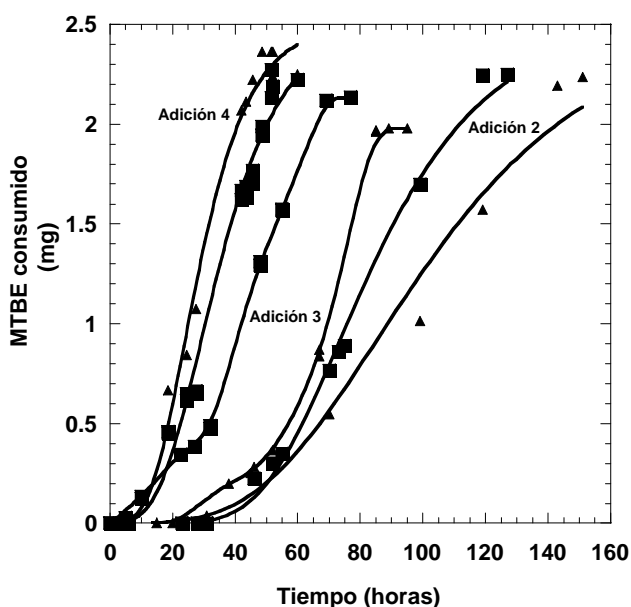


Figura 20. Ajuste del consumo de MTBE por Gompertz (—) para MTBE (-▲-) y para MTBE en presencia de GLIC (-■-).

Las velocidades obtenidas en cada periodo de consumo se hicieron específicas al dividir las entre la biomasa inicial estimada para cada adición de sustrato. Los valores se muestran a continuación.

Tabla 18. Velocidades de consumo de MTBE para el consorcio F y el UAM, en presencia de MTBE y MTBE más GLIC durante los periodos 2, 3 y 4.

Número de adición	Velocidad específica (mg MTBE/gX/h)			C.V (%)
	2	3	4	
Consortio F				
MTBE (control)	7.42	17.1	18.8	6
MTBE + GLIC	10.2	12.07	15.12	7
Consortio UAM				
MTBE (control)	29.38	32.57	-	5
MTBE + GLIC	51.51	52.96	-	6

Coefficiente de variación (C.V) en porcentaje.

Con los datos presentados en la Tabla 18 se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para las velocidades de consumo en donde los tratamientos fueron únicamente la adición de MTBE y el segundo adición de MTBE y GLIC como fuentes de carbono y energía.

El análisis estadístico ANOVA (Anexo 3) muestra que existe diferencia significativa entre los tratamientos empleados (con GLIC y sin GLIC) con un nivel de significancia de 0.000118 (o una precisión del 98%). De igual forma, existe diferencia entre las velocidades de consumo para cada consorcio, ya que el nivel de significancia es menor a 0.005 (precisión del 95%). Esto nos muestra que se obtuvieron mayores velocidades de consumo en presencia de GLIC y que el consorcio UAM mostró las velocidades más altas de consumo de MTBE.

Las pruebas de comparaciones múltiples muestran cuál de los tratamientos es diferente. Una de estas pruebas, Bonferroni, indica que el consorcio UAM estadísticamente presenta las mayores velocidades de consumo específicas. Las velocidades de consumo para MTBE obtenidas por la biomasa generada con GLIC, fueron mayores que cuando el MTBE fue la única fuente de carbono y energía, por otra parte el GLIC favoreció el mantenimiento de las mismas a lo largo de las adiciones. Como se mencionó anteriormente los sistemas alimentados con GLIC presentaron los máximos rendimientos de biomasa compara con los que sólo fueron alimentados con MTBE y fueron éstos los que presentaron las

velocidades de consumo específicas más altas. Con estos resultados se corrobora que el GLIC es el S_{alt} que favorece el incremento de biomasa activa para el consumo de MTBE.

7.4.3 CONSUMO SIMULTÁNEO DE MTBE Y GLICEROL

A continuación se evaluó el consumo de GLIC en presencia de MTBE (Figura 21). El GLIC (0.5 mg) se oxidó totalmente en 25 horas, tiempo durante el cuál también se consumieron 0.5 mg de MTBE. Teóricamente, si ambos sustratos fueran mineralizados, se producirían 0.7 y 1.2 mg de CO_2 para el GLIC y el MTBE consumidos, respectivamente. Experimentalmente se obtuvieron 1.3 mg de CO_2 totales durante este periodo, lo que corrobora el consumo simultáneo de los dos sustratos y la recuperación aditiva del CO_2 . Los resultados sugieren que no existe competición entre estos sustratos a diferencia de lo que ocurrió con el DEE y el MTBE.

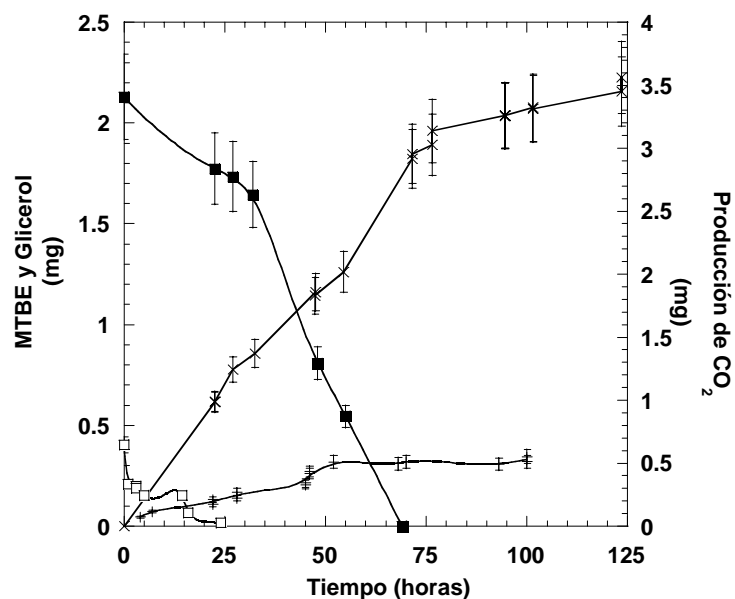


Figura 21. Consumo de MTBE en presencia de GLIC (-■-) así como de GLIC (-□-) durante las primeras 25 horas. Producción de CO_2 para el sistema alimentado con MTBE y GLIC (-X-) y sólo con GLIC (-+-)

7.5 EFECTO DEL GLICEROL EN LA FORMACIÓN DE INÓCULO.

Los resultados obtenidos hasta el momento permiten aseverar que el GLIC es el S_{alt} que permite incrementar la biomasa activa en la degradación de MTBE. El objetivo del siguiente experimento fue evaluar si la biomasa generada solamente con GLIC es capaz de consumir MTBE, es decir si la presencia de este sustrato es indispensable para la inducción del sistema enzimático responsable de la oxidación de MTBE. La adición del GLIC se llevó a cabo solamente durante el primer periodo, adicionando 2.6 μL para favorecer una mayor producción de biomasa en el sistema. Después del consumo total del GLIC, los microcosmos fueron alimentados únicamente con MTBE durante dos periodos. Los consorcios UAM y F se encontraban en esta etapa con sólo un mes de adaptación ya que se decidió obtener también nueva biomasa para inóculo del consorcio UAM por lo que de aquí en adelante todos los experimentos realizados fueron con biomasa con este tiempo de adaptación.

El consorcio F fue capaz de consumir todo el MTBE durante los periodos evaluados. Como se muestra en la Figura 22, se observó la disminución de los tiempos de consumo de MTBE entre adiciones. Esto muestra que el GLIC no inhibe la capacidad de los microorganismos para consumir MTBE y que no es necesaria la presencia de MTBE para la generación de biomasa activa inicialmente. Es decir no se requiere del MTBE como inductor del sistema enzimático cuando empleamos GLIC como S_{alt} .

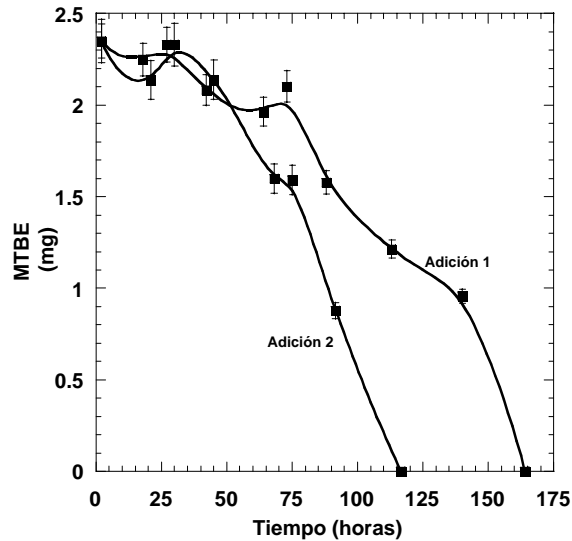


Figura 22. Perfil de la oxidación de MTBE (■) durante dos periodos, después de ser alimentado con GLIC como única fuente de carbono y energía.

Las velocidades obtenidas en los dos periodos se hicieron específicas dividiéndolas entre la biomasa inicial estimada para cada adición. Las velocidades obtenidas durante las dos adiciones fueron de 12.1 y 15.2 mg MTBE/gX/h. Estas velocidades no son estadísticamente distintas de las obtenidas en presencia de MTBE y GLIC. En la Figura 23 se muestran los perfiles del consumo de MTBE ajustados por el modelo matemático Gompertz.

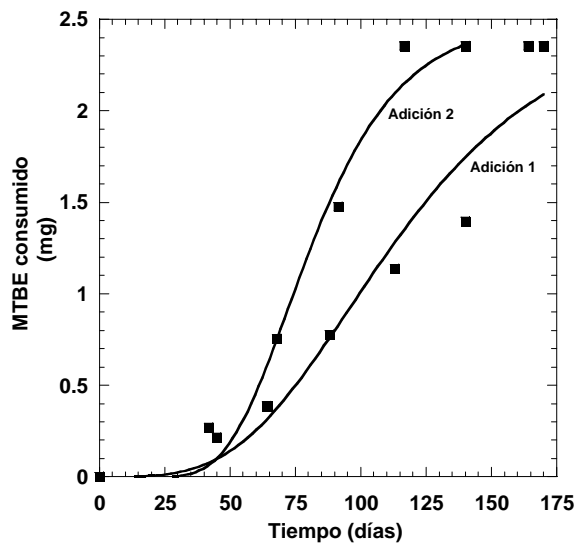


Figura 23. Consumo de MTBE (■) durante dos periodos después de ser alimentado con GLIC ajustados por Gompertz (—).

Autores como Steffan y col., 1997 reportan la existencia de bacterias capaces de oxidar MTBE después de crecer en propano. Estas bacterias presentan velocidades de 20 mg MTBE/gX/h, superiores a las obtenidas en el presente trabajo durante esta etapa.

7.6 MANTENIMIENTO CELULAR.

La energía de mantenimiento es la mínima cantidad de energía necesaria para mantener la integridad y estructura celular. Durante este experimento se evaluó la energía de mantenimiento de los consorcios, lo que permitió corroborar que durante las cinéticas realizadas en experimentos anteriores no existió limitación de nutrientes.

Para ello este experimento se realizó con limitación de nutrientes, empleando una solución de NaCl 0.9% en lugar de medio mineral. Los perfiles de consumo de MTBE se muestran en la Figura 24.

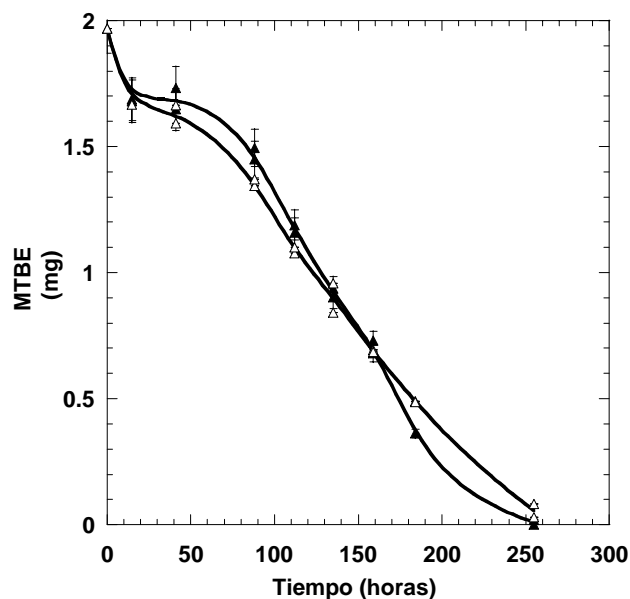


Figura 24 Perfil del consumo de MTBE para el consorcio F (-△-) y UAM (-▲-) bajo limitaciones de nutrientes.

En la Figura 24 podemos observar que los tiempos de consumo para la misma cantidad de MTBE prácticamente se triplicaron en comparación con los tiempos de consumo de MTBE obtenidos en experimentos anteriores. Durante el experimento de mantenimiento celular las velocidades de consumo específicas disminuyeron hasta un 90%, llegando a valores de 3 mgMTBE/gX/h. Esta disminución implica que las células requieren de un alto contenido energético para mantenerse vivas, y con ello se muestra que durante las adiciones de MTBE realizadas en los microcosmos no existió limitación de nutrientes, ya que las velocidades de consumo específicas entre ciclos no disminuyeron (por el contrario, estas se mantenían o incrementaban).

7.7 EVALUACIÓN DE LA RUPTURA DEL AGLOMERADO EN LAS VELOCIDADES DE CONSUMO DE MTBE.

La siguiente parte experimental tuvo como propósito determinar si la destrucción del aglomerado por maceración (homogeneización) disminuye las velocidades de consumo específicas. Al inicio de cada uno de los experimentos el inóculo fue macerado para obtener una muestra homogénea antes de medir proteína. Se observó que durante los primeros experimentos, cuando se inició con la maceración como una alternativa para obtener muestras homogéneas, las velocidades de consumo para los consorcios estuvieron entre 25 y 30 mgMTBE/gX/h, comparadas con las obtenidas actualmente. Después de que los inóculos fueron macerados durante varios ciclos, las velocidades disminuyeron hasta 8 y 18 mgMTBE/gX/h.

Para estos experimentos se emplearon los dos consorcios, en presencia y ausencia de GLIC, homogeneizados y sin homogeneizar. Durante este experimento se adicionaron el GLIC y MTBE en los dos primeros periodos de consumo para generar biomasa y posteriormente sólo se adicionó MTBE. Las velocidades específicas de consumo de MTBE obtenidas se muestran en la Tabla 19.

La comparación de las velocidades de consumo específicas se realizó mediante un análisis de varianza (Anexo 4). El análisis estadístico muestra que no existe diferencia significativa entre los tratamientos, por lo que se llegó a la conclusión de que la homogeneización no disminuye las velocidades de consumo específicas de MTBE y que estas pudieran haber sido afectadas por problemas de mantenimiento del inóculo en los sistemas de dos litros.

Tabla 19. Velocidades de consumo específicas para los consorcios F y UAM, homogeneizados (H) y sin homogeneizar y en presencia o ausencia de GLIC.

Tratamiento/ Adición	Velocidad de consumo específica (mg MTBE/gX/h)					C.V. (%)
	1	2	3	4	5	
	Consortio F					
MTBE + H	10.4	7.6	9.3	12.4	13.4	5
MTBE + GLIC + H	12.3	10.0	8.3	10.8	12.9	4.5
MTBE	9.1	7.8	10.76	10.99	14.87	6
MTBE + GLIC	9.7	11.1	10.8	17.1	17.86	5
	Consortio UAM					
MTBE + H	8.3	7.8	11.2	13.5	-	6
MTBE + GLIC + H	9.8	9.7	11.7	12.9	-	7
MTBE	14.7	10.7	19.2	20.6	-	5.5
MTBE + GLIC	18.0	17.6	11.7	21.6	-	5

C.V. = coeficiente de variación en porcentaje.

7.8 DETERMINACIÓN DE TBA EN FASE LÍQUIDA.

Durante este experimento sólo se adicionó MTBE como fuente de carbono y energía. El objetivo fue el de detectar al TBA en el medio de cultivo para evidenciar si se acumulaba en los microcosmos durante la oxidación del MTBE. El TBA fue evaluado mediante cromatografía de gases, inyectando muestras líquidas. A lo largo de las mediciones sólo fue posible medir el TBA durante la última etapa de consumo de MTBE (Figura 25)

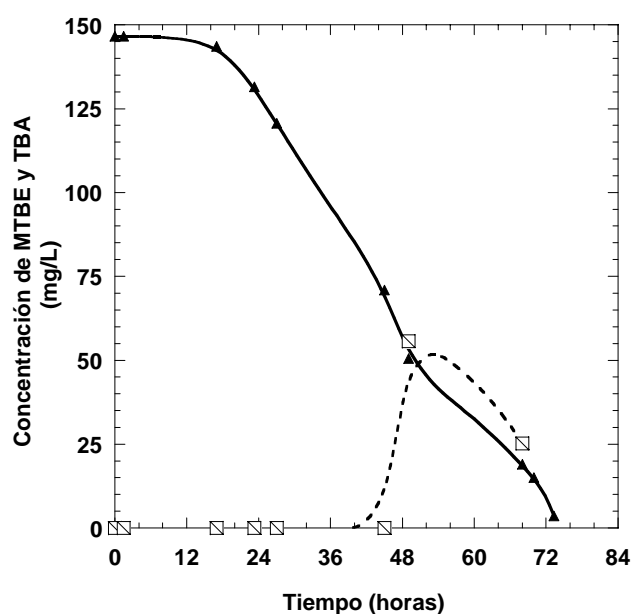


Figura 25. Tendencia del consumo de MTBE (-▲-) y TBA (-◻-) en fase líquida para el consorcio F

Como se muestra en la Figura 25, el consumo de MTBE en líquido se lleva a cabo en alrededor de 70 horas para el primer ciclo de adición. En este mismo ciclo fue posible detectar la presencia y el consumo de TBA a las 48 y 70 horas. En ambos consorcios se observó el mismo comportamiento.

Se evaluó la velocidad de consumo de TBA para los dos consorcios, obteniéndose velocidades similares a las del consumo de MTBE. Estas velocidades fueron de 10 y 13 mg TBA/gX/h para los consorcios F y UAM, respectivamente.

Fortin y Deshusses 1999a, mencionan que el consumo de MTBE está acompañado por la acumulación temporal de un metabolito (posiblemente TBA), debido a la posible competición entre oxigenasas. François y col., 2003 sugieren que es sólo una la monooxigenasa responsable del consumo de MTBE y TBA en la cepa *M. austrofricanum* IFP 2012. Los autores demostraron que la acumulación de TBA se debe a que el TBF tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad monooxigenasa (Figura 26)

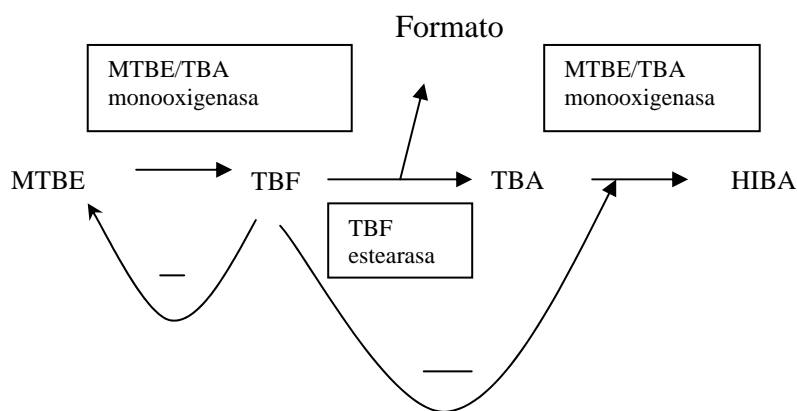


Figura 26. Efecto de regulación durante el metabolismo de MTBE en *M. austrofricanum* IFP 2012.

En nuestro caso, debido a que la velocidad de consumo de TBA (13 mgTBA/gX/h) fue similar a la de MTBE (10-12 mgMTBE/gX/h), se sugiere que la degradación de TBA se lleva a cabo de forma simultánea con el MTBE, por lo que no se observó su acumulación. Sin embargo, otro intermediario distinto al TBA podría estarse acumulando, de forma contraria a lo reportado por Salanitro y col., 1994 quienes encuentran acumulación de TBA en un consorcio mixto llamado BC-1. Las velocidades de consumo para MTBE y TBA obtenidas por dichos autores fueron, sin embargo de 34 y 14 mg/g células/h, respectivamente.

7.9 INFLUENCIA DEL OXÍGENO Y COBALTO EN LA VELOCIDAD DE CONSUMO DE MTBE.

Por otra parte, se evaluaron otros factores que están involucrados en la degradación del MTBE, como lo son el cobalto (que ha sido reportado como necesario para la oxidación de HIBA) y el incremento de la concentración de oxígeno, que también favorece la degradación de este contaminante.

Steffan y col., 1997 reportan que el HIBA es un intermediario de la ruta de degradación del MTBE y que la oxidación de este compuesto puede favorecerse con la presencia de cobalto, por lo que se decidió emplear una concentración de cobalto diez veces superior a la original (2.6 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O/L}$) para comprobar que no estuviera limitado en el medio de cultivo. Las velocidades de consumo específicas obtenidas bajo estas condiciones fueron de 10 y 12 mg MTBE/gX/h para el consorcio F y el UAM, respectivamente (gráfica Anexo 8). Estas velocidades se encuentran dentro del rango de las obtenidas para ambos consorcios en los experimentos previos con lo que se demuestra que el cobalto no se encontraba limitado en el medio de cultivo.

En segundo lugar se evaluó el efecto del incremento de la concentración de oxígeno sobre la degradación del MTBE. A los microcosmos se les hizo pasar una corriente rica en oxígeno y los sistemas fueron cerrados. Se les adicionó MTBE y se evaluó su velocidad de consumo.

En el primer periodo de consumo se observó que sólo el 40% del MTBE alimentado fue oxidado en 70 horas como se muestra en la Figura 27. Posteriormente se modificó la concentración de oxígeno en los microcosmos (destapando los sistemas durante 5 minutos en una campana de flujo laminar), el porcentaje de oxígeno presente en los sistemas fue superior a la atmosférica. Una vez cerrados los microcosmos, se adicionó nuevamente MTBE. En esta ocasión todo el MTBE fue consumido en 50 horas, con una velocidad de 20 mgMTBE/gX/h para los dos consorcios. Estas velocidades fueron superiores a las obtenidas para

los sistemas que contenían 21% de oxígeno ya que bajo las condiciones de aclimatación de los consorcios, las velocidades de consumo específicas fueron de 15 mg MTBE/gX/h.

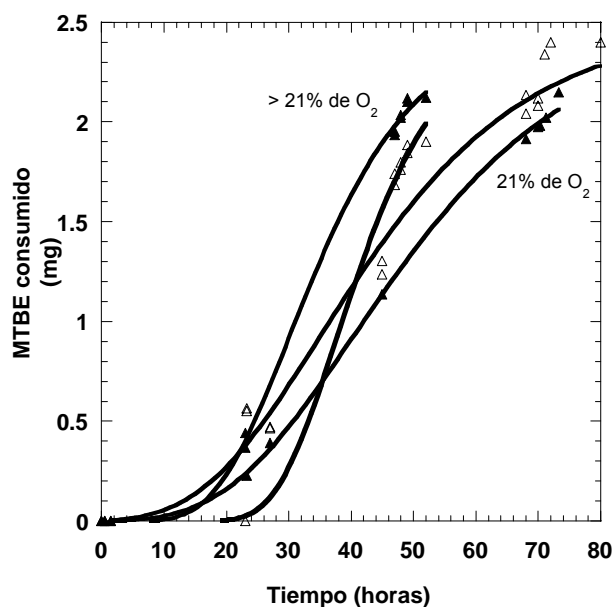


Figura 27. Consumo de MTBE con concentraciones de oxígeno atmosféricas y superiores, para los consorcios UAM (-▲-) y F(-△-), ajustados por Gompertz (—).

Los resultados nos permiten concluir que concentraciones de oxígeno superiores a las atmosféricas favorecen el consumo de MTBE, sin embargo durante el desarrollo del presente trabajo no fue posible determinar la concentración de oxígeno que favoreció el consumo del MTBE, por lo que se sugiere éste como un tema de desarrollo potencial en el futuro. Gandhi y col., 2003 reportan el uso de diversos porcentajes de oxígeno en microcosmos para favorecer el consumo de MTBE. Los autores reportan la oxidación completa del contaminante con concentraciones de oxígeno de 10, 21 y 35% y que, por otra parte el, MTBE sólo fue parcialmente degradado con concentraciones del 50 y 100% de oxígeno. Las posibles razones por las que la velocidad de consumo de MTBE disminuye en presencia de altas concentraciones de oxígeno son: a) Toxicidad por la alta concentración de oxígeno y/o b) Competición por nutrientes entre

microorganismos no degradadores de MTBE que usan carbono orgánico nativo como fuente de carbono y energía (Salanitro y col., 2000).

7.10 OBSERVACIÓN MORFOLÓGICA DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL CONSORCIO F POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Se realizaron observaciones en el microscopio electrónico con la finalidad de comparar las poblaciones del consorcio F alimentado con MTBE y con MTBE más GLIC. El sistema alimentado con GLIC y MTBE se mantuvo bajo estas condiciones durante 6 ciclos consecutivos (aproximadamente mes y medio). Las microfotografías obtenidas se muestran en la Figura 28.

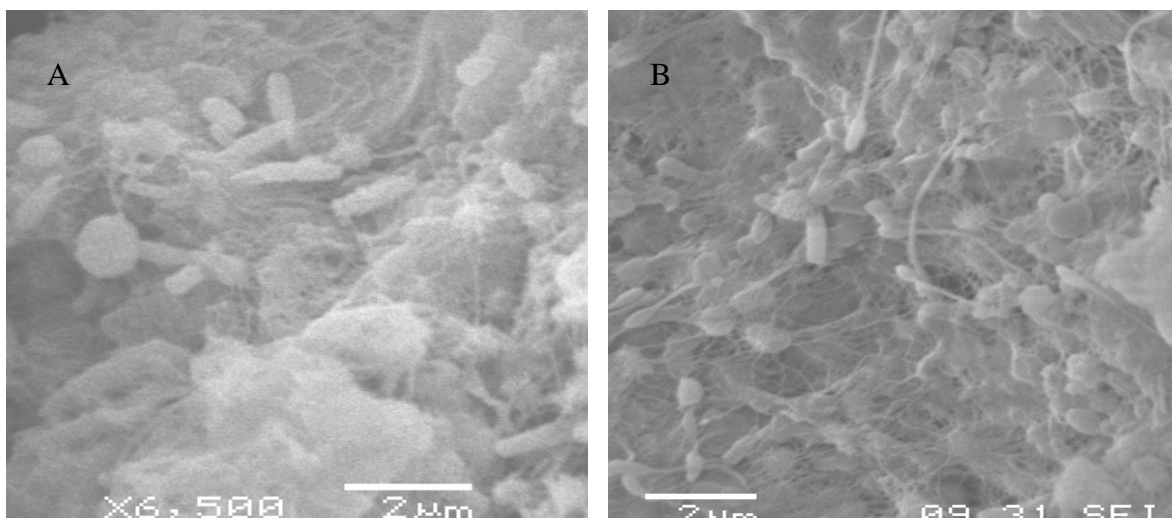


Figura 28. Microfotografías del consorcio F. La foto A corresponde al consorcio alimentado con MTBE como fuente de carbono y energía. En la B se empleó GLIC y MTBE simultáneamente.

La población original del consorcio F, consta principalmente de bacilos y cocos embebidos en exo-polímero. Al comparar las poblaciones microbianas, observamos que en presencia de GLIC la población predominante fue de bacilos flagelados, que tenían 0.8 y 0.5 micras, de largo y ancho respectivamente. Estos bacilos no fueron encontrados al analizar varios campos de observación en el consorcio original alimentado únicamente con MTBE. Esto nos muestra que el consorcio presenta cambios poblacionales influidos por las fuentes de carbono

empleadas. Tal como se observa en los resultados obtenidos por biología molecular del consorcio F (Sección 7.12) en presencia y ausencia de glicerol en donde observamos el predominio de poblaciones al año de ser alimentado con glicerol y MTBE.

7.11 ESTUDIOS DE MICROBIOLOGÍA CONVENCIONAL.

Mediante el uso de metodologías microbiológicas convencionales, tales como el aislamiento de cepas por sembrado en placa, se trató de identificar a las poblaciones microbianas integrantes de los consorcios F y UAM. Se emplearon cajas de petri con medio mineral y agarosa como gelificador, que fueron inoculadas con muestras líquidas de los reactores y almacenadas en atmósferas saturadas con MTBE como única fuente de carbono y energía. Las cajas fueron almacenadas durante más de 15 días bajo estas condiciones, tiempo después del cual se pudo observar el crecimiento de un tipo común de microorganismos en ambos consorcios. Las poblaciones predominantes observadas en las cajas presentaron las siguientes características: color blanco, colonias puntuales, cóncavas y secas.

Después de una resiembra en medio mineral e incubación en atmósferas de MTBE se realizaron aislamientos en medios ricos como agar dextrosa y papa (PDA) y medio Sabraud lográndose distinguir dos tipos de microorganismos (un hongo y una bacteria), los cuales después de varias siembras permanecieron asociados como se muestra en la Figura 29.



Figura 29. Observación al microscopio óptico con el objetivo 4X después de 20 días de incubación.

En experimentos de consumo de MTBE con las dos poblaciones asociadas fue posible observar que consumían 140 mg MTBE/L en alrededor de 72 horas tal como se observó para el consorcio F (gráfica Anexo 9). De las dos poblaciones sólo fue posible aislar la cepa bacteriana, la cuál fue Gram negativo, forma colonias puntuales, cóncavas y de color amarillo (Figura 30). Se le realizó una prueba de consumo de MTBE en la cual se observó que fue capaz de consumir todo el MTBE suministrado (140 mg MTBE/L en medio mineral) con una etapa de adaptación que duró 1 mes.

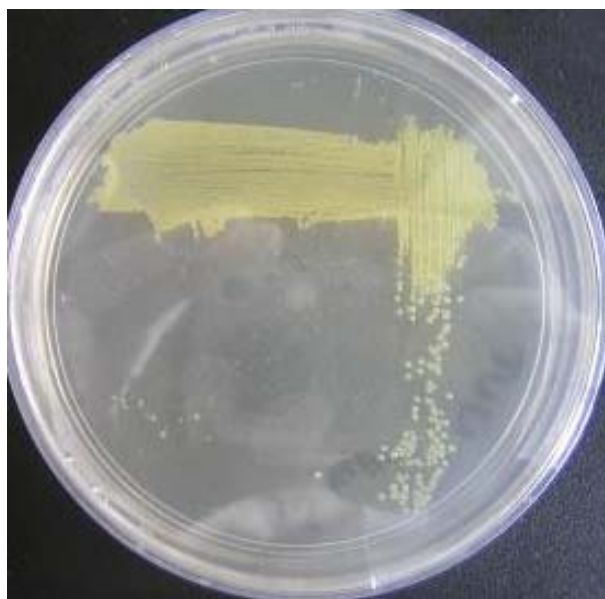


Figura 30. Cepa bacteriana, Gram negativo, incubada en medio mineral en atmósferas saturadas de MTBE.

No fue posible aislar la cepa fúngica debido a que siempre que se hacía crecer en medio mineral con atmósferas de MTBE, durante los 10 primeros días permanecía sin crecimiento bacteriano aparente, pero a partir de este periodo pudo observarse la presencia de la cepa bacteriana.

Estos resultados muestran la posibilidad de obtener cepas tanto fúngicas como bacterianas capaces de consumir el MTBE como única fuente de carbono y energía. Autores como Hardison y col., 1997; Garnier y col., 1999; Hanson y col., 1999; Deeb y col., 2001; François y col., 2002; Fayolle y col., 2003 han reportado el aislamiento de cepas capaces de consumir MTBE, la primera fúngica y las demás bacterianas que pueden mineralizarlo o consumirlo por cometabolismo.

7.12 COMPARACIÓN POBLACIONAL DE LOS CONSORCIOS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE GLICEROL POR AMPLIFICACIÓN AL AZAR DE ADN POLIMÓRFICO (RAPD).

Una vez seleccionado el S_{alt} de interés para el incremento de biomasa activa en el consumo de MTBE se decidió evaluar de manera preliminar, los cambios poblacionales en los consorcios debido al tiempo y a las fuentes de carbono empleadas. Mediante esta técnica se compararon las poblaciones de los consorcios F y UAM alimentados con MTBE y MTBE más GLIC. Las muestras analizadas tuvieron diferentes tiempos de adaptación y fueron etiquetadas como se muestra en la Tabla 20.

Tabla 20. Clasificación de las muestras de los consorcios analizados. Durante el tiempo de adaptación se emplearon las fuentes de carbono que se indican.

Consortio	Fuente de carbono	Tiempo de adaptación.
F	MTBE	2 meses.
Fg	MTBE y GLIC	2 meses
UAM	MTBE	2 meses.
UAMg	MTBE y GLIC	2 meses
F''	MTBE	1 año
Fg''	MTBE y GLIC	1 año
UAM''	MTBE	1 año
UAMg''	MTBE y GLIC	1 año

Para la amplificación al azar del ADN de cada muestra se emplearon 12 cebadores de los cuales sólo 3 (los denominados FO1, 6.1 y 6.2) permitieron obtener información utilizable. Las secuencias de los cebadores son las siguientes; FO1: 5`-ACG-CGC-CCT-3`, 6.1: 5`-ACC-CGG-TCAC-3` y 6.2: 5`-TTC-GAG-CCAG-3`. Se emplearon temperaturas de hibridación de 45°C con el objetivo de evitar la baja reproducibilidad comúnmente achacada a esta técnica.

En el perfil de bandas obtenido con el cebador FO1 (Figura 31) los 4 carriles de la izquierda después del marcador (M) corresponden a muestras de los consorcios con 2 meses de adaptación. Al comparar el perfil de bandas para ambos consorcios observamos que el consorcio UAM y el F presentan un perfil de bandas distinto. Estos cambios podrían indicar la presencia de distintas poblaciones en los consorcios. Podemos observar que básicamente sólo las bandas de 2000, 1500 y 1000 bp presentan similitud entre ellos. Para el consorcio F observamos que el uso de GLIC no provoca cambios aparentes en el perfil de bandas, comparado con el que fue alimentado sólo con MTBE. En el caso del consorcio UAM la presencia de GLIC disminuye la intensidad de las bandas características del consorcio y favorece la presencia de otras. Para ambos consorcios las velocidades de consumo específicas obtenidas en esta etapa son similares al control, lo que corrobora que este S_{alt} no inhibe la capacidad de los microorganismos responsables del consumo de MTBE. Sin embargo para el consorcio UAM podría favorecer la presencia de otros microorganismos debido a la aparición de nuevas bandas.

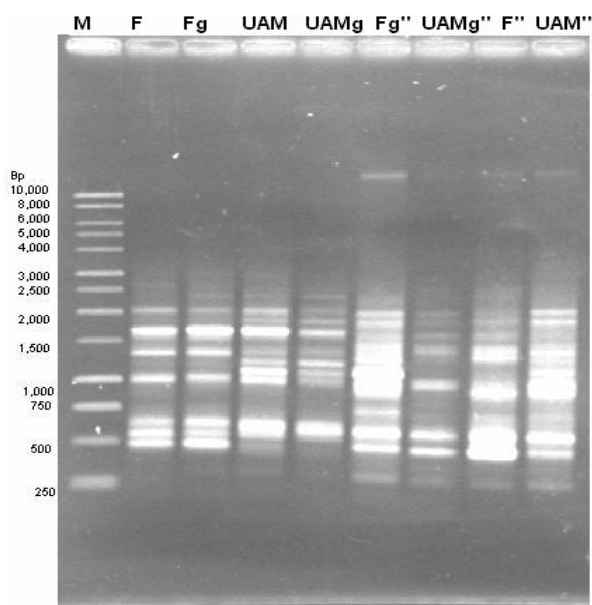


Figura 31. Perfil de bandas obtenido con el cebador FO1 para las muestras del consorcio F y UAM capaces de consumir MTBE, en presencia de GLIC (g) y ausencia del mismo.

La variación en la intensidad de bandas podría indicar un cambio cuantitativo de las poblaciones microbianas (aunque la técnica utilizada no permite evaluar esa característica, ese dato tendría que comprobarse por otras técnicas, como el DGGE). En cualquier caso, la composición de la comunidad tampoco cambia para éste consorcio en presencia de GLIC.

Los 4 carriles de derecha corresponden a muestras con 1 año de adaptación al consumo de MTBE y GLIC. Podemos observar que estas muestras presentan una banda de alrededor de 10,000 bp, que no fue observada en las muestras con 2 meses de adaptación. El perfil de bandas de los consorcios alimentados con MTBE como única fuente de carbono y energía muestra que en el consorcio UAM se incrementó la intensidad de las bandas de 1600, 1500, 500 y 400 bp. También observamos la aparición de una banda de 1100 bp. Lo que muestra que con el tiempo se favorece a los microorganismos responsables del consumo de MTBE ya que bajo estas condiciones se obtuvo la máxima velocidad de consumo específica. En presencia de GLIC se observa el efecto contrario en el patrón de bandas, es decir disminuyen, sin embargo en presencia de este sustrato se obtiene una velocidad de consumo específica superior a la del control, por lo que podría decirse que el consorcio sufre de selección poblacional, debido al tiempo y a los sustratos empleados. Para el consorcio F se observó que después de un año, en general se incrementó la intensidad de todo el patrón de bandas, además de observar la aparición de nuevas bandas cuando se empleo al GLIC como S_{alt} . Sin embargo, no fue posible observar un incremento en las velocidades de consumo específicas, pero si un incremento en los rendimientos de biomasa en presencia de GLIC.

Los perfiles de bandas obtenidos para las muestras con el cebador 6.1 se muestran en la Figura 32.

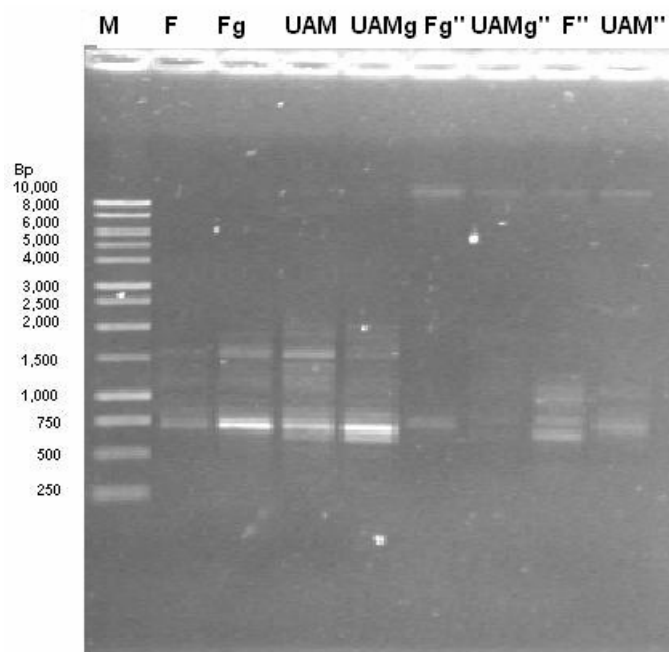


Figura 32. Perfil de bandas para el cebador 6.1, obtenidas a 45°C como temperatura de hibridación, para las muestras del consorcio F y UAM capaces de consumir MTBE, en presencia de GLIC (g) y ausencia del mismo.

De igual forma que con el cebador anterior los 4 carriles de izquierda después del marcador (M) corresponden a muestras con 2 meses de aclimatación. Los perfiles de bandas para los consorcios F y UAM alimentados con MTBE como única fuente de carbono y energía muestran bandas extra para el consorcio UAM a los 700 y 800 bp aproximadamente. Esto podría estar relacionado con la diversidad poblacional de los consorcios. También se observa mayor intensidad en las bandas del consorcio UAM, lo que podría indicar (con las precauciones anteriormente mencionadas) una mayor cantidad de microorganismos en este consorcio. Por otra parte, para ambos consorcios se puede observar en presencia de GLIC un incremento en la intensidad de las bandas obtenidas.

Después de un año de aclimatación (últimos cuatro carriles) se observa que el número de bandas en las muestras disminuyó considerablemente. Es decir, los consorcios tienden a simplificar sus comunidades en forma muy notoria, lo que probablemente es debido a la especialización de los consorcios por el tiempo de

exposición a las fuentes de carbono empleadas. En presencia de GLIC se observa una mayor disminución del número de bandas. La notable pérdida de bandas podría indicar que sólo los microorganismos más especializados o los más aptos son los que sobreviven ya que en el caso del consorcio F las velocidades de consumo específicas se mantienen, para el consorcio UAM en esta etapa se obtienen las mayores velocidades de consumo.

Por último se empleó el cebador 6.2 con el cuál se obtuvo el siguiente patrón de bandas:

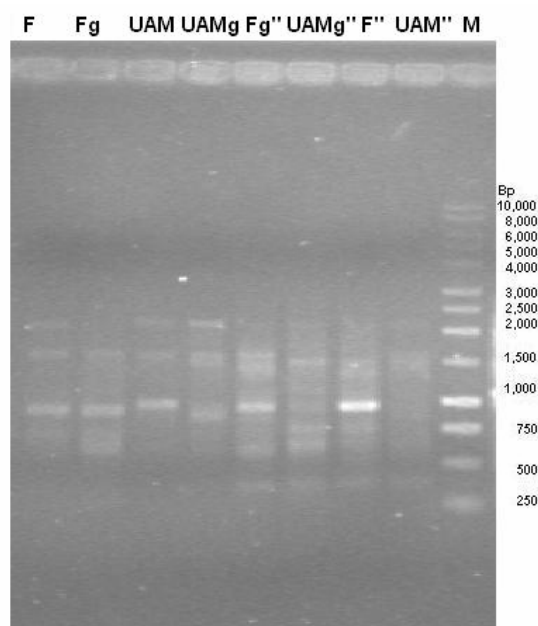


Figura 33. Perfil de bandas obtenidas con el cebador 6.2 a 45°C de temperatura de hibridación, para muestras del consorcio F y UAM (U) capaces de consumir MTBE, en presencia de GLIC (g) y ausencia del mismo.

Los primeros 4 carriles corresponden a muestras con 2 meses de adaptación. Con este cebador sólo fue posible observar una diferencia entre los consorcios alimentados con MTBE como única fuente de carbono y energía en la banda de 1000 bp, ya que en el consorcio UAM se encuentra ligeramente por arriba de este tamaño. Para el consorcio F en presencia de GLIC se observa un cambio en el patrón de bandas, similar a lo observado para el consorcio UAM en las mismas condiciones.

Después de un año de aclimatación sólo es posible observar que una banda de 1000 bp perteneciente al consorcio F se intensificó, lo cuál podría indicar el predominio de un tipo de microorganismo en el consorcio. La presencia de GLIC no provocó cambios en el bandeo correspondiente a los distintos consorcios. La disminución de bandas no esta relacionada con bajos rendimientos de biomasa.

Debido a que existen cepas identificadas en cuanto a su capacidad de degradar MTBE (*Pseudomonas*, *Proteobacterias*, *Mycobacterias* y un hongo, *Graphium* sp.), se esperaba obtener alguna similitud en los patrones de bandas de los dos consorcios. Lo anterior no fue demostrado, ya que con el primer F01 los perfiles de bandas presentaron grandes diferencias. Las variaciones en las secuencias de bandas indican que las poblaciones microbianas están en constante cambio, tanto por las fuentes de carbono empleadas (GLIC) como por el tiempo de aclimatación y adaptación al medio ambiente.

8. Conclusiones.

Los sustratos alternos empleados favorecieron la disminución de la etapa de adaptación del consorcio F durante la etapa de stress, además permitieron que el consorcio microbiano mantuviera la capacidad de consumir MTBE. Las velocidades de consumo específicas obtenidas para cada uno de los sustratos alternos fueron desde 7 mg MTBE/g X/h para el ELEV y hasta 30 mg MTBE/g X/h para el ISO, mientras que en el sistema alimentado con MTBE como única fuente de carbono y energía fue de 13 mgMTBE/gX/h.

El ELEV, el DEE, el ISO, el HIBA y el GLIC favorecieron el incremento en biomasa, pero sólo el GLIC mantuvo las velocidades de consumo específicas. Los resultados mostraron que en presencia de DEE el MTBE fue degradado sólo hasta la completa eliminación del DEE. Por otra parte el GLIC fue consumido de forma simultánea al MTBE, ya que durante las primeras 24 horas de la cinética el sustrato alternativo fue completamente utilizado y el MTBE también presentó oxidación durante este periodo. Este comportamiento fue corroborado midiendo directamente el consumo de GLIC y mediante los balances de la producción de CO₂ durante las 24 horas. Con esto se demostró que el GLIC no ejerce ningún efecto inhibitorio o de competencia durante la oxidación de MTBE.

Se demostró que el empleo de GLIC de forma simultánea y consecutiva al MTBE no inhibe la capacidad de los microorganismos responsables del consumo de MTBE. Sin embargo, favorece el incremento de biomasa en ambos consorcios los cuales alcanzaron rendimientos de hasta 0.27 g/g, con velocidades de consumo de MTBE de hasta 20 y 16 mg MTBE/g X/h para los consorcios F y UAM, respectivamente. Estas velocidades fueron ligeramente superiores a las obtenidas por el control, el cual presentaba la mitad de biomasa.

Se comprobó que el uso del GLIC para el incremento de inóculo favoreció la biomasa activa, ya que se alcanzaron las máximas velocidades de consumo específicas de MTBE las cuales fueron de 30 y 20 mg MTBE/gX/h para el consorcio F y UAM, respectivamente. Por lo que sugerimos que no hubo un

incremento excesivo de poblaciones que consumen el sustrato de fácil asimilación y que no son capaces de degradar MTBE.

Las velocidades de consumo obtenidas durante el presente trabajo se encuentran dentro del rango de velocidades reportadas en la literatura (7-53 mg MTBE/gX/h). Sin embargo cabe mencionar que los consorcios microbianos estudiados hasta ahora llevaban a cabo la degradación de MTBE como única fuente de carbono y energía, sin requerir la presencia de sustrato alternativo, tal como ha sido reportado para otros sistemas donde se observó la degradación cometabólica (Hardison y col., 1997; Garnier y col., 1999). Al comparar las máximas velocidades obtenidas para diferentes sistemas microbianos con las del presente trabajo, encontramos que con el consorcio F se obtuvo una velocidad máxima de 30 mgMTBE/gX/h en presencia de GLIC, similar a la reportada por Salanitro y col., 1994 y superior a la reportada por Fortin y col., 2001. El consorcio UAM con GLIC alcanzó velocidades de hasta 50 mg MTBE/g X/h, sólo comparables con las reportadas por Francois y col., 2002

Autores como Steffan y col., 1997; Hatzinger y col., 2001 y Fortin y col., 2001 reportan el uso de fuentes de carbono alternas (ELEV, DEE, HIBA, glucosa, etc) para favorecer el incremento de microorganismos capaces de oxidar MTBE, pero en ningún caso mencionan el incremento en las velocidades de consumo para este contaminante. En el presente trabajo el empleo de GLIC como sustrato alternativo condujo al incremento de los rendimientos de biomasa de 0.6 y 0.27 g/g para el consorcio F y UAM, respectivamente, así como al incremento de las velocidades de consumo específicas para el MTBE.

Demostramos que el GLIC puede ser empleado como un sustrato de fácil asimilación para generar inóculos activos para el consumo de MTBE, en presencia o ausencia inicial del contaminante, ya que se evaluó la capacidad del inóculo generado con GLIC para oxidar MTBE, encontrando que la oxidación de MTBE se llevó a cabo con periodos de consumo mayores a los observados anteriormente.

Sin embargo, estos tiempos de consumo fueron disminuyendo en los ciclos sucesivos.

Se observó la necesidad de mantener cerrados por 48 horas más los sistemas que habían oxidado completamente el MTBE, debido a que la producción de CO₂ fue constante después de este tiempo. Esto indica la acumulación de un intermediario en la oxidación de MTBE o la lenta asimilación del compuesto. Sin embargo, no fue posible observar la acumulación de TBA como lo reportan Hardison y col., 1997; Steffan y col., 1997 y Fayolle y col., 2003. Lo anterior sugiere que la degradación de TBA en los consorcios F y UAM es llevada a cabo de forma simultánea al MTBE, lo que fue corroborado al obtenerse una velocidad de degradación de TBA similar a la de MTBE.

La recuperación de carbono como biomasa y CO₂ después de la mineralización del MTBE fue de alrededor del 90% en el consorcio F, lo cual muestra que no se generan intermediarios que pudieran ser más tóxicos que el contaminante inicial. En el consorcio UAM observamos que aún después de las 48 horas para la producción de CO₂ la máxima recuperación de carbono como biomasa y CO₂ fue de 85%, obteniéndose un máximo de 30% de carbono en biomasa. Esto indica que existe la posibilidad de la presencia de algún intermediario distinto al TBA.

Comprobamos que la homogeneización del inóculo o la destrucción del agregado no tiene efecto negativo sobre la velocidad de consumo específica. Es decir, la separación de poblaciones por este hecho no daña la capacidad de los microorganismos de consumir MTBE.

Mediante técnicas de microscopía electrónica fue posible observar la diversidad poblacional en ambos consorcios. Las preparaciones mostraron un alto porcentaje de exo-polímero que mantiene unidas a las especies microbianas. El consorcio F mostró principalmente la presencia de cocos y bacilos de aproximadamente 1 y 2 micras, mientras que el consorcio UAM estuvo constituido por una población de bacilos de 1 micra y cocos flagelados menores a 1 micra de largo. En ambos

consorcios fue posible observar la presencia de cepas fúngicas pero en menor proporción que las bacterianas.

Los estudios de microbiología convencionales permitieron observar dos especies microbianas (hongo y bacteria) asociadas capaces de degradar MTBE con el mismo perfil de consumo que el consorcio F. Esto sugiere que estas poblaciones son algunas de las responsables del consumo de MTBE. También fue posible aislar una cepa bacteriana capaz de degradar MTBE, empleándolo como única fuente de carbono y energía, tal como lo reportan Steffan y col., 1997; Hanson y col., 1999; Hatzinger y col., 2001 y Francois y col., 2002.

La técnica de amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD) nos permitió observar reproducibilidad en los patrones de bandas amplificadas gracias al incremento en la temperatura de unión del cebador. Estos patrones de bandas permitieron observar los cambios poblacionales en los consorcios debidos al tiempo y al uso de las fuentes de carbono empleadas, como el GLIC y MTBE. Las poblaciones microbianas pueden verse afectadas por los efectos antes mencionados de tal forma que éstas puedan o no mantenerse en el consorcio. Esto fue corroborado, ya que después de un año de aclimatación se observó la disminución del número de bandas considerablemente. Los consorcios F y UAM estudiados muestran un perfil de bandas diferente por lo que se considera que las poblaciones microbianas en cada uno son distintas.

9. BIBLIOGRAFÍA.

1. Achten C., Kolb A. y Püttmann W. (2002) Methyl tert-butyl ether (MTBE) in river and wastewater in Germany. *Environ. Sci. Technol.* 36, 3652-3661.
2. Acuña M., Pérez F., Auria R., y Revah S. (1999) Microbiological and Kinetic Aspects of a Biofilter for the Removal of Toluene from Waste Gases *Biotechnology and bioengineering*, 63(2): 175-194.
3. Amberg A., Rosner E. y Dekant W. (2000) Toxicokinetics of methyl tert-butyl ether and its metabolites in humans after oral exposure. *Toxicological Sciences.* 61:62-67.
4. Barreto R.D., Gray K.A. y Anders K.(1995) Photocatalytic Degradation Of Methyl-tert-Butyl Ether in TiO₂ Slurries: A Proposed Reaction Scheme. *Water Res.* 29(5):1243-1248.
5. Bradley P.M., Chapelle F.H. y Landmeyer J. E. (2001) Effect of redox conditions on MTBE biodegradation in surface water sediments. *Environ. Sci. Technol.*, 35:4643-4647.
6. Bravo H.A y Torres R.J. 1990. El aire en la ciudad de México. Unión de Grupos Ambientalistas I. A. P. www.union.org.mx.
7. Breen A., Rope A.F., Taylor D., Loper J.C. y Sferra P.R. (1995) Application of DNA amplification fingerprinting (DAF) to mixed culture bioreactors. *J. Ind. Microbiol.* 14, 10.
8. Brown A., Devanny J.S., Browne T.E. y Chitwood D. (1997) A review of treatment technologies for methyl tertiary butyl ether (MtBE) in drinking water. *Proceedings of the ACS 1997 Pacific Conference on Chemistry and Spectrometry.* Komex H₂O science. 1-19.
9. Hernández A., Magaña M., Cárdenas B., Hernández S. y Revah S (2001) Methyl-tert-butyl ether (MTBE) elimination by cometabolism: laboratory and pilot plant results. For presentation at the Air & Waste Management Association's 94th Annual Meeting & Exhibition, June 24-28, Orlando Florida.

10. Chauvaux S., Chevalier F., Le Dantec C., Fayolle F., Miras I., Kunst F y Beguin P (2001) Cloning of a genetically unstable cytochrome P-450 Gene Cluster Involved in Degradation of the pollutant Ethyl tert-butyl Ether by *Rhodococcus ruber*. *Journal of Bacteriol.* 183(22):6551-6557.
11. Choi S.J., Song K.I. y Lee Y.W. (2000) Simulation and experimental study on the polymer membrane reactors for the vapor-phase MTBE (metjyl tert-butyl ether) decomposition. *Catalysis Today.* 56:275-282.
12. Church C.D., Tratnyek P.G. y Scow K.M. (2000). Pathways for the degradation of MTBE and other fuel oxygenates by isolate PM1. Symposia paper presented before the Division of Environmental Chemistry March 26-30, 2000. *In Preprints of Extended Abstracts* 40(1): 261- 263.
13. Deeb R. y Alvarez-Cohen L. (2000) Aerobic biotransformation of gasoline aromatics in multicomponent ixtures. *Bioremediation Journal.* 4(1):1-9.
14. Deeb R., Chu K., Shih T., Linder., Suffet I., Kavanaugh M. y Alvarez-Cohen L. (2003) MTBE and other oxygenates: environmental sources, analysis, occurrence and treatment. *Environ. Engin Sci.* 20(5): 433-447.
15. Deeb R., Hu H., Hanson J., Scow K. y Alvarez-Cohen L., (2001) Substrate interactions in BTEX and MTBE mixtures by an MTBE-degrading Isolate. *Environ. Sci. Technol.* 35:312-317.
16. Dupasquier D., Revah S., y Auria R., (2002) Biofiltration of Methyl *tert*-Butyl Ether Vapors by Cometabolism with Pentane: Modeling and Experimental Approach. *Environ. Sci. Technol.* 36:247-253
17. EEUU Environmental Protection Agency (1994) Health risk perspectives on fuel oxygenates. U. S. Environmental Protection Agency publication no. EPA 600/R-94/217. U. S. Environmental Protection Agency Office of research and development., Washington, D. C.
18. EEUU Environmental Protection Agency (1998) MTBE Fact Sheet #2 Remediation Of MTBE Contaminated Soil and Groundwater. www.epa.gov/OUST/mtbe/
19. EEUU Environmental Protection Agency (2000) 40 CFR Part 755. Methyl tertiary Butyl ether (MTBE): Advance Notice of Intent to Initiate Rulemaking

- Under the toxic substances Control Act to Eliminate or Limit the Use of MTBE as a fuel additive in gasoline, Federal Register. 65(58):16094-16109
20. Fayolle F., Francois A., Garnier L., Godefroy D., Mathis H., Piveteau P. y Monot F (2003) Limitations in MTBE biodegradation. Oil & Gas Science and Technology. 58(4):497-504.
 21. Fayolle F., Vandecasteele J.P., Monot F., (2001) Microbial degradation and fate in the environment of methyl tert-butyl ether and related fuel oxygenates. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56:339–349.
 22. Finneran, K. T. y Lovley D. R., (2001). Anaerobic Degradation of Methyl tert-Butyl Ether (MTBE) and Tert-Butyl Alcohol (TBA). Environ. Sci. Technol. 35:1785-1790.
 23. Fiorenza S., y Rifai H. S., (2003) Review of MTBE biodegradation and bioremediation. Bioremediation Journal. 7(1):1-35.
 24. Fortin N. Y. y Deshusses M., (1999a). Treatment of Methyl tert-butyl ether vapors in biotrickling filters. 1. Reactor Startup, Steady-state Performance, and Culture Characteristics. Environ. Sci. Technol. 33:17, 2980-2986.
 25. Fortin N. Y. y Deshusses M., (1999b). Treatment of Methyl tert-butyl ether vapors in biotrickling filters. 2. Analysis of the rate-limiting step and behavior under transient conditions. Environ. Sci. Technol. 33(17):2987-2991.
 26. Fortin N., Morales M., Nakagawa Y., Focht D.D. y Deshusses. M.A. (2001). Methyl tert-butyl ether (MTBE) degradation by a microbial consortium. Environ. Microbiol. 3:407-416.
 27. Francois A., Garnier L., Mathis H., Fayolle F., y Monot F. (2003) Roles of tert-butyl formate, tert-butyl alcohol and acetone in the regulation of methyl tert-butyl ether degradation by *Mycobacterium austrosfricanum* IFP 2012. Appl. Microbiol. Biotechnol. 62:256-262.
 28. Francois A., Mathis H., Godefroy D., Piveteau P., Fayolle F. y Monot F. (2002) Biodegradation of Methyl tert-butyl ether and other fuel oxygenates by a new strain, *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012. Appl. and Environ. Microbiol. 68(6):2754-2762.

29. Fujiwara Y, Kinoshita T, Sato H y Kojima I (1984). Biodegradation and bioconcentration of alkylethers. *Yugagaku*. 33:111-114.
30. Gandhi D., Hristova K., Mackay D. M. y Scow K.M. (2003) Biodegradation of MTBE the effect of environmental factors. For presentation at the Seventh International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium (Orlando, FL; June 2003), published by Battelle Press, Columbus, OH.
31. Garnier. P. M., Auria R., Augur C. y Revah S. (1999) Cometabolic biodegradation of methyl t-butyl ether by *Pseudomonas aeruginosa* grown on pentane. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:498-503.
32. Green K.R. y Lowenbach W.A. (2001) MTBE Contamination: Environmental, Legal, and Public Policy Challenges. *Environmental Forensics*. 2, 3-6.
33. Hanson J., Ackerman C. y Scow K. (1999). Biodegradation of Methyl tert-butyl Ether by a Bacterial Pure Culture. *Appl. and Environ. Microbiol.* 65(11):4788-4792.
34. Hardison L., Curry S., Ciuffetti L. y Hyman M. (1997). Metabolism of Diethyl Ether and Cometabolism of Methyl tert-Butyl Ether by a Filamentous Fungus, a *Graphium* sp. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(8):3059-3067.
35. Hatzinger P., McClay K., Vainberg S., Tugusheva M., Condee C., y Steffan R. (2001) Biodegradation of Methyl tert-butyl ether by a pure bacterial culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(12):5601-5607.
36. Hitzig R., Kosteci P y Leonard D. (1998) Study reports LUST programs are feeling effects of MTBE releases. *Soil Groundwater Cleanup* Aug/Sept 1998: 15-19.
37. Honty G. (2004) Cambian plomo en la nafta por MTBE, poderoso cancerígeno. <http://www.ecoportal.net/noti02/na069.htm>
38. Hu C., Acuna-Askar K. y Englande, Jr. A.J. (2004) Bioremediation of methyl tertiary-butyl ether (MTBE) by an innovate biofilter. *Water Sci. and Technol.* 49(1):87-94.
39. Hyman M., Know P., Williamson K. y O'Reilly K. (1998) Cometabolism of MTBE by alkane-utilizing microorganisms. In: *Natural attenuation of MTBE*.

- Wickramanayake, G. B. and R. E. Hinchee, Eds., pp.321-326. Batelle Press, Columbus, Ohio.
40. Hyman, M. y O`Reilly K., (1999) Physiological and enzymatic features of MTBE-degrading bacteria. In: Alleman BC & Leeson A (Eds) Proceeding of the fifth international in Situ and On-site Bioremediation Symposium (5: 7-12). Batelle Press, Columbus.
41. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI) (2000) Censos generales de población y vivienda. México varios años.
www.inegi.gob.mx
42. Javanmardian M. y Glasser H.A. (1997) In-situ biodegradation of MTBE using biosparging. Division of Environmental Chemistry. Proceedings from 213th ACS National Meeting, p 424.
43. Johnson R., Pankow J, Bender D, Price C. y Zogorski J. (2000) MTBE: to what extent will past releases contaminate community water supply wells?. *Environ. Sci. Technol.* 34:210A-217A
44. Kinner N.E. (2001) Fate, transport and remediation of MTBE. The University of New Hampshire. Abril 2001. www.asce.org/pdf/kinnertestimony.pdf
45. Koenigsberg S.S., Sandefur C.A, Mahaffey W.R., Deshusses M. y Fortin N.Y., (1999) Peroxygen mediated bioremediation of MTBE. In *Situ bioremediation of Petroleum Hydrocarbon and Other Organic Compounds*. Alleman B.C. and Leeson A. (eds.), Batelle Press: Columbus, Ohio. 5(3):13-18.
46. Lacy R. (1994) efectos del uso de gasolinas en la calidad del aire del valle de México. *Rev. Soc. Quím. Méx.* 39(2):111-117.
47. Mackay D., Shiu W. Y. y Ma K. C. (1993) *Illustrated Handbook of physical-chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals. Volatile Organic Chemicals*. Lewis Publishers. Volume III, Boca Raton, FL., p.962
48. Malley, J.P., Jr., Eliason, P.A. y Wagler, J.L. (1993) Point-of-entry treatment of petroleum contaminated ground water. *Water Environ Res.* 65(2):119-128.

49. Meesters P.A.E.P, Huijberts G.N.M y Eggink G.(1996) High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Appl Microbiol Biotechnol.* 45:575-579
50. Mo K., Lora C.O., Wanken A.E., Javanmardian M., Yang, X. y Kulpa C.F. (1997) Biodegradation of methyl T-butyl ether by pure bacterial cultures. *Appl Microbiol Biotechnol.* 47(1):69-72.
51. Morales M. Y Deshusses M. (1999) Simulation of In-Situ Bioremediation Proceses for MTBE in Laboratory soil columns. Department of Chemical and Environmental Engineering . University of California Riverside. www.engr.ucr.edu/mdeshuss/mtbe.html
52. Morales M., Velázquez E. y Razo E., (2003) Biodegradation of MTBE and gasoline in various soil samples from polluted sites in Mexico. <http://ipec.utulsa.edu/conf2001/morales39.pdf>.
53. Morales M., Velázquez E., Jam J., Revah S., Gónzález U. y Razo E. (2004) Methyl tert-butyl ether biodegradation by microbial consortia obtained from soil samples of gasoline-polluted sites in Mexico. *Biotechnol. Lett.* 26:269-275.
54. Mormile M.R., Liu S. y Suflita J.M. (1994) Anaerobic Biodegradation of Gasoline Oxygenates: Extrapolation of Information to Multiple Sites and Redox Conditions. *Environ. Sci. Technol.* 28:1727-1732.
55. Pitre M. P. y Steffan R. (1999) Biotreatment of MTBE-contaminated groundwater in membrane bioreactor. *Envirogen Report.*
56. Razo-Flores E., Olguín-Lora P., Alcántara S., y Morales Ibarría M. (2004) Studies in surface science and catalysis. *Petroleum Biotechnology, developments and perspectives.* Capitulo 9. Biotreatment of water pollutants from the petroleum industry. Instituto Mexicano del Petróleo, México. ELSEVIER. Pp 513-527
57. Salanitro J.P. (1995) Understanding the limitations of microbial metabolism of ether used as fuel octane enhancers. *Curr. Opin. Biotechnol.* 337-340.

58. Salanitro J.P., Diaz L.A., Williams M.P. y Wisniewski H.L. (1994) Isolation of a bacterial culture that degrades methyl t-butyl ether. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2593-2596.
59. Salanitro J.P., Johnson P.C., Spinnler G.E., Maner P.M., Wisniewski H.L. y Bruce C. (2000) Field-Scale Demonstration of Enhanced MTBE Bioremediation through Aquifer Bioaugmentation and Oxygenation. *Environ. Sci. Technol.* 34:4152-4162.
60. Salanitro J.P., Spinnier G.E., Neaville C.C., Maner P.M., Steams S.M. Johnson P.C. y Bruce C. (1999) Demonstration of the enhanced MTBE bioremediation (FMB) in situ process. In: Alleman –bc & Lesson A (Eds) *Proceedings of the Fifth International In Situ and On-site Bioremediation Symposium* Batelle Press, Columbus. (5:37-46).
61. Santander G. R., (1968) *Técnicas de microscopía electrónica en biología.* Editorial Aguilar.
62. Schifter I., Díaz L., Avalos S., Vera M., Barrera A. y López Salinas E., (2000) Effect of methyl tertiary butyl ether concentrations on exhaust emissions from gasoline used in the metropolitan area of Mexico city. *Journal of the Air & Waste Management Association.* 50: 488-494.
63. SEMARNAT (2002) *Calidad del aire en ciudades mexicanas. Compendio de estadísticas ambientales.*
64. Slöstrand S. F., (1967) *Electron Microscopy of cells and tissue. Volume 1. Instrumentation and techniques.* Edit. Academic Press. New York.
65. Smith D.F., Kleindienst T.E., Hudgens E.E., Mciver C.D. y Bufalini J.J. (1991) The Photooxidation of Methyl tertiary butyl Ether. *International Journal of Chemical Kinetics*, Vol. 23.
66. Steffan R.J., Mack J. y Bolton J.R., (2000a) Degradation pathways during the treatment of methyl tert-butyl ether by the UV/H₂O₂ process. *Environ Sci and Technol.* 34(4):650-658.
67. Steffan R.J., McClay K., Vainberg S., Condee C.W., y Zhang D. (1997) Biodegradation of the Gasoline Oxygenates Methyl tert-butyl Ether, Ethyl

- tert-butyl Ether and tert-Amyl Methyl Ether by Propane-Oxidizing Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 63 (11):4216-4222.
68. Steffan RJ, Vainberg S, Condee C, McClay K. y Hatzinger P (2000b) Biotreatment of MTBE with a new bacterial isolate. In: Wickramanayake GB, Gavaskar AR, Alleman BC, Magar VS (eds) Bioremediation and phytoremediation of chlorinated and recalcitrant compounds. Battelle, Columbus, Ohio. 165–173
69. Stocking A.J., Deeb R.A., Flores A.E., Stringfellow W., Talley J., Brownell R. y Kavanaugh M. C (2000). Bioremediation of MTBE: a review from a practical perspective. Biodegradation. 11:187-201.
70. Suflita J.M. y Mormile M. R. (1993) Anaerobic Biodegradation of Known- and potential Gasoline Oxygenates in the Terrestrial Subsurface. Environ. Sci. Technol. 27:976-978.
71. Theron J. y Cloete T. E., (2000) Molecular Techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. Crit. Rev. Microb. 26(1):37-57.
72. Tidswell E.C., Russell N.J. y White, G. F. (1996) Ether Bond Scission in the biodegradation of alcohol ethoxylate nonionic surfactants by *Pseudomonas* sp. Strain SC5A. Microbiology 142:1123-1131.
73. Watson M. (1996) Treatment Of Alternatives For MTBE in Groundwater. Applied Research Department Technology Transfer Note #11, September 1996.
74. Wong Kwong-Kwok., Cheng R., Saffer J., Ralph D., Welsh J., y McClelland M., (1996) DNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR (RAPDs) Molecular Microbial Ecology Manual. 3.4.2:1-14
75. Yeh C.K. y Novak J.T. (1994) Anaerobic Biodegradation of Gasoline Oxygenates in Soils. Wat. Environ. Res. 66:744-752.
76. Yeh J.I., Charrieir V., Paulo J., Hou L., Darbon E., Clairborne Al., Hol W.G.H. y Deutscher J. (2004) Structures of Enterococcal Glycerol Kinase in the Absence and Presence of Glycerol: Correlation of Conformation to

Substrate Binding and a Mechanism of Activation by Phosphorylation.
Biochemistry 2004. 43:362-373

10. Anexos.

Anexo 1 Extracción de ADN de lodos.

Se toma una muestra de lodo de 0.25 a 1 g. Remover el contenido del tubo con solución Bead a un tubo limpio, depositar en el tubo vacío la muestra pesada. Centrifugar a 14000 rpm durante 1 minuto. Eliminar el líquido y agregar la solución Bead. Agitar en vórtex durante un tiempo de 3-10 segundos. Adicionar 60 μ L de la solución S1. Agitar en vórtex durante 3-4 segundos y calentar a 70°C durante 5 minutos. Adicionar 200 μ L de la solución IRS. Agitar en vórtex durante 3-10 segundos. Calentar a 70°C durante 5 minutos. Agitar en vórtex durante 3-10 segundos. Calentar a 70°C durante 5 minutos. Agitar en vórtex durante 3-10 segundos. Centrifugar durante 1 minuto a 14000 rpm. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio. Agregar 250 μ L de la solución S2. Agitar en vórtex durante 5 segundos. Incubar en hielo frappe (4°C) durante 5 minutos. Centrifugar a 14000 rpm durante 1 minuto. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio. Adicionar 1.3 mL de la solución S3. Agitar en vórtex durante 5 segundos. Filtrar la muestra en un tubo con filtro durante 1 minuto a 14000 rpm. Decantar el líquido. Adicionar 300 μ L de la solución S4. Centrifugar durante 1 minuto a 14000 rpm. Decantar el líquido. Centrifugar durante 1 minuto a 14000 rpm. Colocar el filtro en un tubo limpio y adicionar 50 μ L de la solución S5 al centro del filtro. Esperar alrededor de 3 minutos. Centrifugar 1 minuto a 14000 rpm. Descartar el filtro ya que el filtrado contiene el ADN extraído.

Anexo 2 Cálculos para producción de CO₂ y velocidades de consumo de MTBE.

A) CO₂

Para obtener las masas de CO₂ y O₂ se emplearon las áreas obtenidas por el integrador y se relacionaron con las siguientes formulas para obtener los porcentajes de CO₂ y O₂ en la muestra.

$$\%O_2 = (\text{area}O_2/\text{area}N_2) * (79.1/0.9953)$$

$$\%CO_2 = (\text{area}CO_2/\text{area}N_2)*((\text{area}N_2*\text{area}O_2)/\text{area aire}) *(70.4735)$$

Los porcentajes se emplearon en la formula de gases ideales para obtener los moles de CO₂ en el sistema.

$$PV = nRT$$

$$n = (P*(\%/100)*V_{\text{fase gas}}) /RT$$

Donde:

P = Presión ambiental

V_{fase gas} = Volumen de la fase gaseosa del sistema.

R = Constante de los gases ideales.

T = Temperatura de trabajo.

B) VELOCIDADES DE CONSUMO.

Para obtener las velocidades de consumo de MTBE para cada uno de los consorcios, se empleo el modelo matemático de Gompertz, que nos permite determinar la velocidad de consumo de un sustrato empleando todas sus fases del consumo. Este modelo fue ejecutado en el programa KaleidaGraph para Windows.

La ecuación empleada fue:

$$Sc = \alpha * (\exp(-\beta * \exp(-\kappa * t)))$$

Sc = Sustrato consumido.

α = La máxima concentración del sustrato que se puede consumir.

β = Parámetro relacionado con las condiciones iniciales ($S = S_0 = \alpha * (\exp(-\beta))$)

κ = Velocidad de consumo de sustrato (h^{-1})

Anexo 3 Análisis de varianza.

Análisis de varianza

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
Term						
A: tratamiento	1	369.6959	369.6959	77.83	0.000118*	1.000000
B: consorcio	1	2461.063	2461.063	518.08	0.000000*	1.000000
AB	1	259.9298	259.9298	54.72	0.000313*	0.999971
S	6	28.50201	4.750335			
Total (Adjusted)	9	3565.821				
Total	10					

* Term significant at alpha = 0.05

Pruebas de compraciones multiples de Bonferroni

Variable respuesta: velocidad

Termino evaluado: consorcio

Alpha=0.050 Error Term=S DF=6 MSE=4.750335 Critical Value=2.446912

Grupo	Cantidad	Media	Diferente De grupo
a	5	10.5589	F
b	5	44.66282	UAM

Pruebas de compraciones multiples de Bonferroni.

Variable respuesta: velocidad

Termino evaluado: tratamiento

Alpha=0.050 Error Term=S DF=6 MSE=4.750335 Critical Value=2.446912

Grupo	Cantidad	Media	Diferente de Grupo
1	4	20.16409	2
2	6	32.57537	1

Anexo 4. Análisis de varianza para la ruptura del aglomerado.

Los tratamientos realizados fueron:

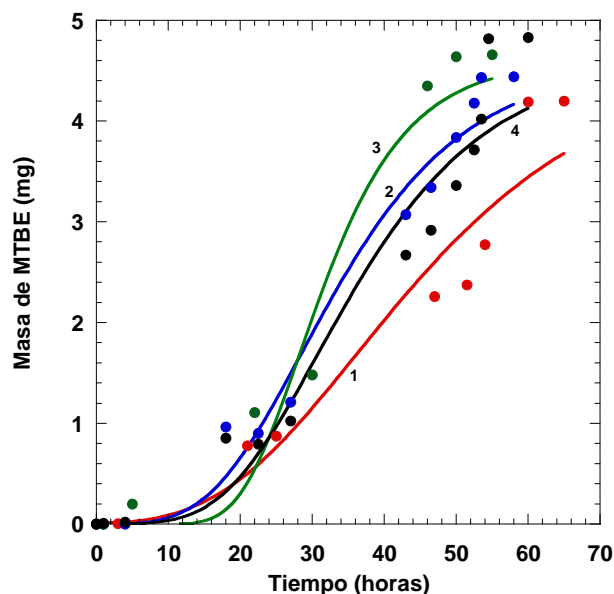
- 1= Consorcio homogeneizado
- 2= Consorcio sin homogeneizar y sin glicerol.
- 3= Consorcio con glicerol sin homogeneizar.
- 4= Consorcio homogeneizado con glicerol.

Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.005)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: Tratamientos	3	743.6653	247.8884	1.24	0.312676	0.075372
B: consorcio	1	77.63953	77.63953	0.39	0.538166	0.013497
AB	3	44.97459	14.99153	0.07	0.973121	0.006981
C: Ciclos	4	821.5167	205.3792	1.02	0.409679	0.069253
AC	12	1362.341	113.5284	0.57	0.852390	0.053125
BC	4	482.1675	120.5419	0.60	0.664490	0.033231
ABC	12	2709.721	225.8101	1.13	0.374309	0.172205
S	32	6415.934	200.4979			
Total (Adjusted)	71	13548.78				
Total	72					

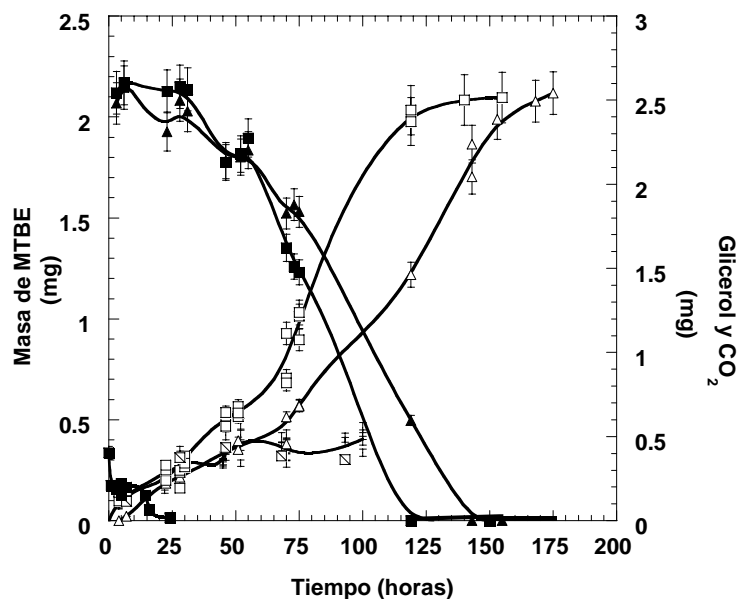
Term significant at alpha = 0.005

Anexo 5. Consumo de MTBE en presencia de DEE (-●-) durante 4 adiciones consecutivas, ajustados por Gompertz.

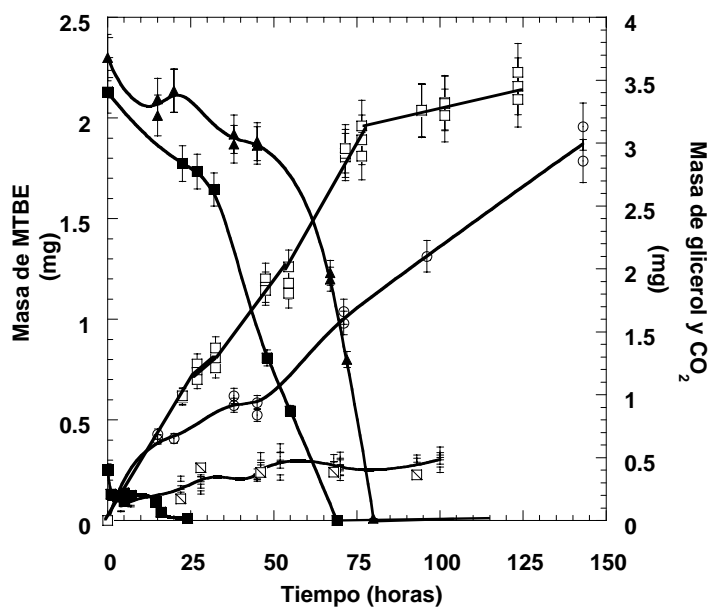


Anexo 6. Consumo simultáneo de MTBE (-▲-) en presencia de GLI (-■-) durante tres ciclos de adición para el consorcio F, así como la producción de CO₂ para MTBE (-△-), MTBE más GLIC(-□-) y sólo GLIC (-⊠-).

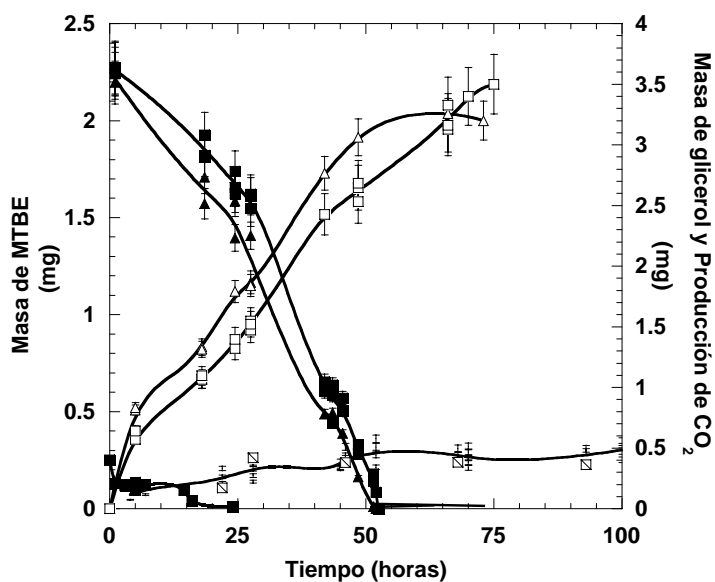
Primera adición



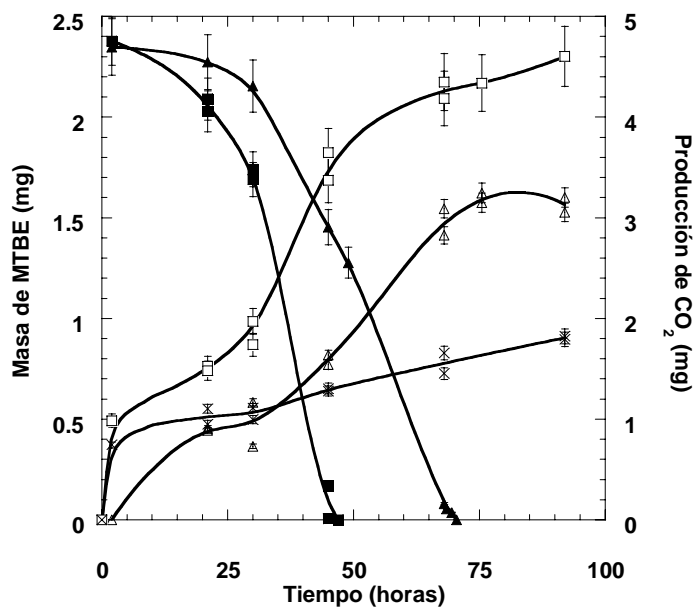
Segunda adición.



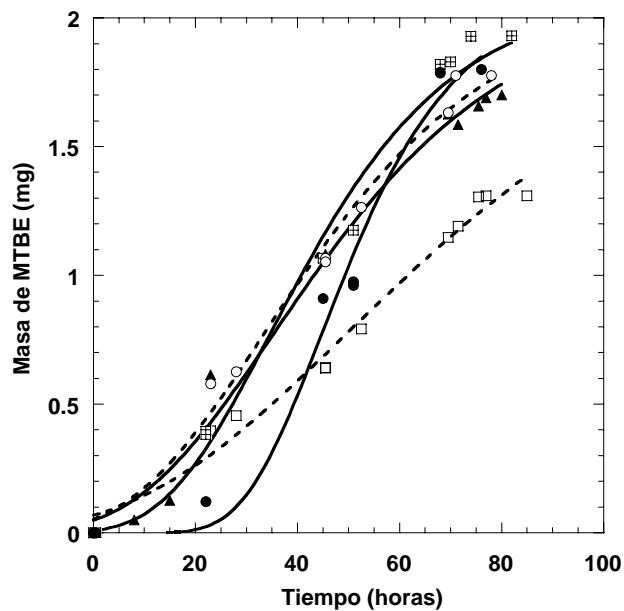
Tercera adición



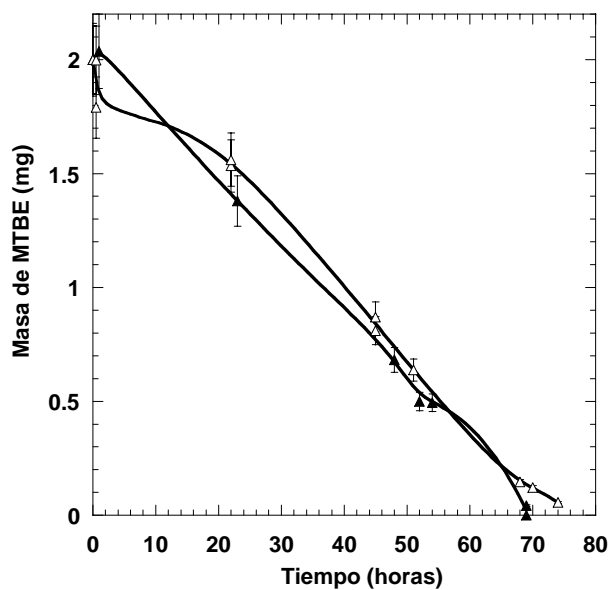
Anexo 7 Consumo simultáneo de MTBE (-▲-) en presencia de GLIC (-■-) para el consorcio UAM así como la producción de CO₂ para MTBE (-△-), MTBE más GLIC(-□-) y sólo GLIC (-⊠-).



Anexo 8. Consumo de MTBE (-▲-) en presencia de Cobalto con una concentración 10 veces superior a la empleada a lo largo de los experimentos. Consorcio F durante los ciclos 1(-■-) y 2(-▣-) así como para el consorcio UAM para los ciclos 1(-○-) y 2 (-●-) ajustados por Gompertz.



Anexo 9. Consumo de MTBE por población fúngica obtenida por glicerol para el consorcio F (-△-) y UAM (-▲-).

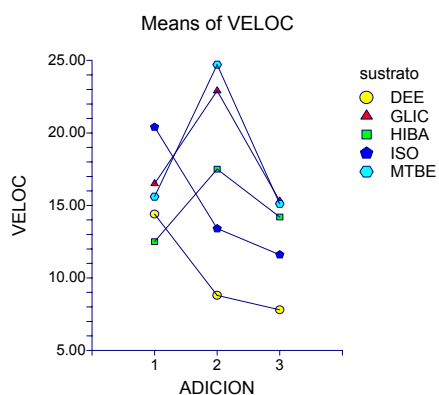


Anexo 10. ANOVA del experimento para velocidades de consumo específicas de MTBE.

Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
(Alpha=0.005)						
A: ADICION	2	56.164	28.082			
B: sustrato	4	130.8507	32.71267			
AB	8	117.0893	14.63617			
S	0	0				
Total (Adjusted)	14	304.104				
Total	15					

* Term significant at alpha = 0.005

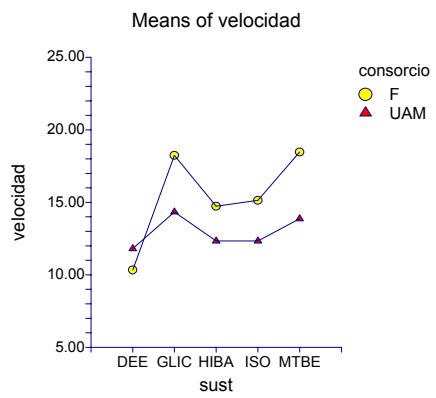
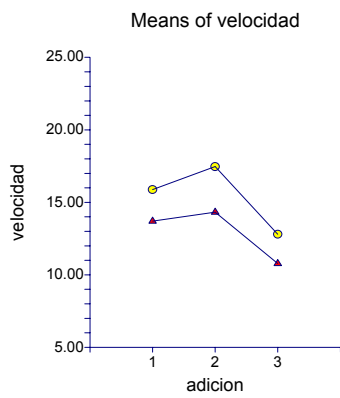


Anexo 11. ANOVA de velocidades de consumo específicas entre consorcios.

Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
(Alpha=0.005)						
A: adicion	2	90.06667	45.03333			
B: sust	4	112.072	28.018			
AB	8	92.21	11.52625			
C: consorcio	1	44.89633	44.89633			
AC	2	1.834667	0.9173333			
BC	4	33.28533	8.321333			
ABC	8	50.86867	6.358583			
S	0	0				
Total (Adjusted)	29	425.2337				
Total	30					

* Term significant at alpha = 0.005



El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación de resultados.

“Caracterización cinética y propagación de consorcios microbianos capaces de eliminar metil tert-butil éter (MTBE)”

Que presentó

Angélica López Moreno

En octubre del 2005.

Director: Dr. Sergio Revah Moiseev. 

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Asesora: Dra. Marcia Morales Ibarría. 

Instituto Mexicano del Petróleo.

Asesora: Dra. Elvia Inés García Peña. 

Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI)-IPN

Sinodal: Dr. Francisco José Fernández Perrino. 

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Sinodal: Dra. Flor de María Cuervo López. 

Universidad Autónoma Metropolitana.