



# Cinética de biodegradación de mezclas BTEoX-EMTB por medio de un proceso de bioaumentación

KARIM ACUÑA ASKAR\*, JUAN F. VILLARREAL CHIU\*, MIRIAM V. GRACIA LOZANO\*, ROLANDO TIJERINA MENCHACA\*, MARÍA T. GARZA GONZÁLEZ\*\*, BENJAMÍN CHÁVEZ GÓMEZ\*\*\*, IRAM P. RODRÍGUEZ SÁNCHEZ\*, HUGO A. BARRERA SALDAÑA\*

**B**enceno, tolueno, etilbenceno y los isómeros del xileno (BTEX), en conjunto con el éter metil terbutílico (EMTB), son los compuestos orgánicos volátiles más comunes presentes en los sitios contaminados con petróleo. Los depósitos subterráneos, los sitios de producción, y los derrames accidentales de petróleo son la fuente más importante de la contaminación de suelo y de agua subterránea con BTEX y EMTB.<sup>1</sup> Estos compuestos se incluyen en la lista de contaminantes regulados por la USEPA, dentro de los estándares de agua potable para consumo humano, donde los límites máximos permisibles para BTEX son de 0.005, 1.0, 0.7 y 10 mg/L, respectivamente, mientras que para el EMTB es de 20-40 mg/L.<sup>2</sup> En México, los límites máximos permisibles para los BTEX en agua potable son de 0.05, 0.3, 0.7 y 0.5 mg/L, respectivamente.<sup>3</sup>

Varios estudios muestran que de los tres isómeros del xileno (*orto*, *meta* y *para-xileno*) el *orto-xileno* es el más recalcitrante.<sup>4</sup> Adicionalmente, se reportó que el isómero *orto* posee una mayor resistencia a ser metabolizado que el *meta* y el *para-xileno*,<sup>5</sup> y que el uso de surfactantes no iónicos aporta un potencial alternativo al incrementar la solubilidad del sustrato.<sup>6</sup>

Este estudio se basa en la evaluación de las cinéticas de biodegradación de los BTEX en conjunto y en presencia de EMTB por un consorcio

microbiano previamente bioaumentado y aclimatado a gasolina sin plomo. Los efectos del suelo y la adición de un surfactante no iónico, el Tergitol NP-10 (TNP-10) en las cinéticas de biodegradación, también se evaluaron.

## Materiales y métodos

**Condiciones de aclimatación.** El benceno, tolueno, el etilbenceno, el *o*-xileno y el TNP-10 fueron marca Sigma-Aldrich (México), con una pureza igual o superior a 98%. El agar nutritivo y el agar bacteriológico fueron marca Difco y BIOXON, respectivamente. El medio BOD se empleó en el reactor de aclimatación de biomasa, de acuerdo a las siguientes concentraciones: (mg/L),<sup>7</sup>  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 17;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 44;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 67;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 23;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 3.4;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 40;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1. El medio mineral concentrado (MM) se preparó para resuspender las células bacterianas después de centrifugarlas y tuvo la siguiente composición (g/L)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 6;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3;  $\text{NaCl}$ , 1;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5;  $\text{CaCl}_2$ , 0.011;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.001. El medio mineral con sustrato (SMM) se preparó para los bioensayos experimentales y para evaluar las constantes cinéticas de biodegradación,

\* Facultad de Medicina, UANL.

\*\*Facultad de Ciencias Químicas, UANL.

\*\*\*Instituto Mexicano del Petróleo.

y consistió de MM y 50 mg/L de cada BTEoX y 50 mg/L EMTB.

**Aclimatación de inóculo con enriquecimiento a BTEoX.** La biomasa se aclimató con gasolina en un reactor de tipo intermitente de 19 litros, con un volumen de trabajo de 8 litros, con un intervalo de aireación de 8.3-8.6 mg/L de oxígeno disuelto. Se determinaron los sólidos suspendidos volátiles (SSV) con el método estándar 2540.<sup>8</sup>

**Bioensayos experimentales y bioaumentación.** Una alícuota de 480 mL de licor madre fue tomada del reactor de aclimatación repartidos en 12 tubos Falcon® (BD 352098). El inóculo de 2 mL de biomasa concentrada se agregó a los bioensayos experimentales para lograr 880 mg/L de SSV. Este procedimiento se realizó para las réplicas. En los bioensayos se usó una concentración inicial de 50 mg/L de cada BTEoX y 50 mg/L de EMTB. Las muestras control contenían solamente MM y 50 mg/L de cada BTEoX y 50 mg/L de EMTB (SMM). El grupo de muestras número 1 contenía 20 mL de SMM y 880 mg/L de SSV. El grupo de muestras número 2 contenía 20 mL de SMM, 880 mg/L de SSV, y 18.5% de suelo estéril (SE). El grupo número 3 contenía 20 mL de SMM, 880 mg/L de SSV, 18.5% de SE y 25 mg/L de TNP-10. Se monitorearon las concentraciones de los BTEoX en un período de 36 horas, cada 6 horas. Para las cinéticas de biodegradación se usaron viales EPA de vidrio de borosilicato de 40 mL con teflón en la boca del vial (Wheaton Science Products, Millville, NJ), con un volumen máximo de trabajo de 22 mL, dejando un espacio necesario para la respiración.

**Esterilización de muestras.** Los medios y agares se esterilizaron en una autoclave Presto (Industrias Steele, México) a 121°C 15 a psi por 15 minutos. El suelo se esterilizó en las mismas condiciones en tres intervalos de 15 min.

**Incubación y análisis.** El control y las muestras fueron incubadas y agitadas en una incubadora oscilatoria New Brunswick (Fisher Scientific, Pittsburg, PA) modelo R76. La agitación se mantuvo a 200 rpm a 30°C, durante 36 horas. Los BTEoX se analizaron por cromatografía de gases con detección de ionización de flama. Las determinaciones se hicieron de acuerdo a procedimientos estandarizados con algunas modificaciones.<sup>9</sup> Se empleó una

columna de 100m x 0.25mm DI x 0.5µm de película de sílica. La temperatura empezó en 60°C y se mantuvo por 30 minutos, después la temperatura aumentó de acuerdo a un programa previamente establecido.<sup>8</sup> El inyector se mantuvo en el modo split/splitless y su temperatura fue de 250°C. La temperatura del detector fue de 300°C. El volumen de muestra purgado fue de 5 mL, se realizó con nitrógeno por 10 minutos, y los sustratos se concentraron antes de inyectarse al cromatógrafo.

### Modelos de evaluación cinética

Primer orden, una fase. Este modelo describió el comportamiento de la biodegradación de *o*-xileno y se obtuvo de la siguiente ecuación:

Modelo I,<sup>10</sup>

$$S_t = S_0 \exp(-Kt) \quad (1)$$

donde:  $S_t$  = Concentración del sustrato a tiempo  $t$ , (mg/L);  $S_0$  = Concentración del sustrato a tiempo cero, (mg/L);  $K$  = Constante global de primer orden,  $K = k X_v$ ,  $X_v = \text{SSV}$ , (mg/L);  $k$  = Constante específica  $h^{-1}(\text{mg/L})^{-1}_{\text{SSV}}$ ;  $t$  = Tiempo (h). Las constantes globales  $K$  fueron obtenidas de graficar  $\ln S_t$  contra tiempo.

Primer orden, dos fases. Este modelo describió el comportamiento del benceno, tolueno y etilbenceno y fue obtenido de la siguiente ecuación: Modelo II,<sup>11</sup>

$$S_t = S_1 \exp(-K_1 t) + S_2 \exp(-K_2 t) \quad (2);$$

donde:  $S_t$  = Concentración del sustrato a tiempo  $t$ , (mg/L);  $S_1$  = Concentración del sustrato a tiempo cero en la primera fase, (mg/L);  $S_2$  = Concentración del sustrato a tiempo cero en la segunda fase, (mg/L);  $K_1$  = Constante cinética de la primera fase, ( $h^{-1}$ );  $K_2$  = Constante cinética de la segunda fase, ( $h^{-1}$ );  $k_1$  = Constante específica de la primera fase  $h^{-1}(\text{mg/L})^{-1}_{\text{SSV}}$ ;  $k_2$  = Constante específica de la segunda fase  $h^{-1}(\text{mg/L})^{-1}_{\text{SSV}}$ ;  $k_{1,2} = K_{1,2}/X_v$ ;  $t$  = Tiempo (h). Las constantes globales  $K$  se obtuvieron de graficar  $\ln S_t$  contra tiempo.

Orden cero. Este modelo describió el comportamiento del EMTB y se obtuvo de la ecuación:

Modelo III,

$$S_t = -Kt + S_0 \quad (3)$$

donde:  $S_0$  = Concentración del sustrato a tiempo cero, (mg/L);  $K$  = Constante global de primer orden,  $K = k X_v$ ;  $X_v = \text{SSV}$ , (mg/L);  $k$  = Constante específica  $\text{h}^{-1}(\text{mg/L})^{-1}_{\text{SSV}}$ ;  $t$  = Tiempo (h). Las constantes globales  $K$  se obtuvieron de graficar  $\ln S_t$  contra tiempo.

La metodología de comprobación de todas las cinéticas se hizo por medio de un análisis de regresión, evaluando la confiabilidad de los modelos cinéticos para representar los datos por medio del coeficiente de correlación. Con base en esta metodología se escogieron los modelos cinéticos evaluados.

## Resultados y discusiones

Todos los BTEoX se biodegradaron en la presencia de un consorcio microbiano bioaumentado a 880 mg/L SSV. El benceno se removió más rápido que el *o*-xileno, y éstos a su vez se removieron más lentamente que el tolueno y el etilbenceno. No se observó una diferencia significativa entre las velocidades de remoción del tolueno y el etilbenceno.

El suelo tuvo un impacto negativo en las velocidades de biodegradación de todos los BTEoX, principalmente en las velocidades de remoción del benceno y del *o*-xileno. La reducción significativa de las velocidades de biodegradación de los BTEoX, causada por el suelo, se puede explicar por un descenso de la solubilidad del sustrato en el agua, posiblemente debida a la interacción hidrofóbica entre el suelo y los sustratos.<sup>12</sup> La adición de TNP-10 claramente mostró una tendencia a restaurar la disponibilidad de los BTEoX en agua. Las velocidades de remoción del benceno, etilbenceno y *o*-xileno se restauraron en alrededor de 50% por la adición de TNP-10 a las muestras que contenían las suspensiones de suelo. La velocidad de remoción del tolueno, sin embargo, tuvo un impacto negativo significativo por la adición de TNP-10.

El benceno y el *o*-xileno presentaron un modelo de velocidad de biodegradación de primer orden de una fase, mientras que el tolueno y el etilbenceno

siguieron una cinética de remoción de primer orden de dos fases bajo las mismas condiciones experimentales en los tres grupos de muestras evaluadas (tabla I).

Acerca de los modelos cinéticos para las mezclas de BTEoX y EMTB, es muy escasa la bibliografía, las pruebas de confiabilidad de los datos mostraron de una manera consistente que el tolueno y el etilbenceno presentaron una velocidad de remoción bifásica con un cambio de pendiente muy notorio a las doce horas de iniciados los bioensayos.

Las constantes cinéticas de velocidad de la primera fase fueron considerablemente mayores que las correspondientes a las constantes cinéticas de velocidad de la segunda fase, sugiriendo que las velocidades de remoción del tolueno y etilbenceno podrían haber sido influidas por algún tipo de interacción de los sustratos.<sup>13</sup>

Las constantes de velocidad de remoción del benceno en todos los bioensayos experimentales fueron consistentemente mayores que las constantes de velocidad de remoción del *o*-xileno.

El EMTB presentó un modelo de velocidad de remoción de orden cero en los tres grupos de muestras evaluados (tabla II). La presencia de fuentes de carbono fácilmente asimilables, tales como los BTEoX, podrían haber limitado la biodegradación del EMTB. La presencia del suelo, sin embargo, triplicó el efecto positivo en la velocidad de biodegradación del EMTB. La adición de TNP-10, por su parte, mostró un ligero incremento en la velocidad de remoción del EMTB.

Tabla II. Constantes cinéticas de EMTB vs. muestras de bioensayos.

	K globales [mgL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] (r)	k específicas [mgL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> (mg/L) <sup>-1</sup> vss] (r)
Grupo muestras 1	0.14 (0.994)	1.6 x 10 <sup>-4</sup> (0.994)
Grupo muestras 2	0.37 (0.989)	4.2 x 10 <sup>-4</sup> (0.989)
Grupo muestras 3	0.45 (0.991)	5.0 x 10 <sup>-4</sup> (0.991)

Tabla I. Constantes cinéticas de velocidad vs. muestras de bioensayos.

	Benceno	Tolueno		Etilbenceno		<i>o</i> -Xileno
<b>Grupo muestras 1</b>						
K globales [h <sup>-1</sup> ]	K	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	K
	0.16	0.20	0.08	0.22	0.09	0.06
(r)	(0.985)	(0.999)		(0.999)		(0.986)
k específicas [h <sup>-1</sup> (mg/L) <sup>-1</sup> ]	k	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	k
	1.8 x 10 <sup>-4</sup>	2.4 x 10 <sup>-4</sup>	0.90 x 10 <sup>-4</sup>	2.5 x 10 <sup>-4</sup>	1.0 x 10 <sup>-4</sup>	0.76 x 10 <sup>-4</sup>
(r)	(0.985)	(0.999)		(0.999)		(0.986)
<b>Grupo muestras 2</b>						
K globales [h <sup>-1</sup> ]	K	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	K
	0.09	0.18	0.01	0.18	0.11	0.02
(r)	(0.978)	(0.999)		(0.999)		(0.985)
k específicas [h <sup>-1</sup> (mg/L) <sup>-1</sup> ]	k	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	k
	1.0 x 10 <sup>-4</sup>	2.1 x 10 <sup>-4</sup>	0.15 x 10 <sup>-4</sup>	2.1 x 10 <sup>-4</sup>	1.2 x 10 <sup>-4</sup>	0.26 x 10 <sup>-4</sup>
(r)	(0.978)	(0.999)		(0.999)		(0.985)
<b>Grupo muestras 3</b>						
K globales [h <sup>-1</sup> ]	K	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	K
	0.12	0.15	0.04	0.33	0.06	0.04
(r)	(0.983)	(0.999)		(0.999)		(0.986)
k específicas [h <sup>-1</sup> (mg/L) <sup>-1</sup> ]	k	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	k
	1.4 x 10 <sup>-4</sup>	1.7 x 10 <sup>-4</sup>	0.45 x 10 <sup>-4</sup>	3.8 x 10 <sup>-4</sup>	0.70 x 10 <sup>-4</sup>	0.44 x 10 <sup>-4</sup>
(r)	(0.983)	(0.999)		(0.999)		(0.986)

Como se indicó en la tabla III, la biodegradación del EMTB fue de 15.2% y se incrementó a 24.8% con la adición de suelo y en presencia del surfactante llegó hasta 30.2%.

Tabla III. Porcentajes de biodegradación vs. muestras de bioensayos.

	B	T	E	<i>o</i> X	EMTB
Grupo muestras 1	99.0	99.1	99.5	89.8	15.2
Grupo muestras 2	95.1	97.2	99.5	56.0	24.8
Grupo muestras 3	97.8	98.9	98.8	74.9	30.2

## Conclusión

Las velocidades de biodegradación del benceno y del *o*-xileno se describieron por un modelo cinético de primer orden de una sola fase, mientras que las biodegradaciones del tolueno y del etilbenceno siguieron un modelo cinético de primer orden de dos fases en todas las muestras. El EMTB presentó un modelo cinético de remoción de orden cero en todas las muestras. El suelo desaceleró significativamente la velocidad de biodegradación de todos los BTEoX, teniendo el mayor efecto negativo en la biodegradación de *o*-xileno. Por otra parte, la presencia del suelo estimuló la velocidad de remoción del EMTB, y la adición del TNP-10 a las muestras acuosas que contenían suelo, estimuló las velocidades de remoción en todos los sustratos evaluados, con excepción del tolueno. La velocidad de biode-

gradación del benceno fue mayor que las del *o*-xileno en todas las muestras. Las velocidades de remoción del tolueno y etilbenceno fueron mayores que las del benceno en todas las muestras. No se encontraron diferencias considerables entre las velocidades de biodegradación del tolueno y del etilbenceno, excepto en aquéllas en las que se adicionó TNP-10, y en las que, por lo tanto, se estimuló la velocidad de biodegradación del etilbenceno. El EMTB mostró la velocidad más baja de biodegradación entre todos los sustratos que se evaluaron. Los porcentajes de remoción de los sustratos estuvieron en los intervalos de 95.1-99.5% para el benceno, tolueno y etilbenceno. Las remociones porcentuales del *o*-xileno y del EMTB estuvieron en los intervalos de 56.0-89.8% y 15.2-30.2%, respectivamente.

## Resumen

Se evaluó la cinética de biodegradación de los BTEoX y EMTB, con 880 mg/L de SSV, en presencia y ausencia de suelo y TNP-10 en un total de 36 horas con intervalos de muestreo de 6 horas. La biodegradación de benceno y *o*-xileno presentó un modelo cinético de primer orden de una sola fase; tolueno y etilbenceno un modelo de primer orden de dos fases y el EMTB presentó un modelo de remoción de orden cero en todas las muestras. Los porcentajes de remoción se encuentran entre 95.1-99.5% para benceno, tolueno y etilbenceno. Para el *o*-xileno 56.0-89.8% y EMTB 15.2-30.2%.

**Palabras clave:** Bioaumentación, Biodegradación, Biorremediación, BTEX, EMTB.

## Abstract

BTEoX and MTBE biodegradation kinetics were evaluated using 880 mg/L VSS, with and without soil and TNP-10 for 36 hours, every 6 hours. Benzene and *o*-xylene biodegradations followed a first-order one-phase kinetic model, whereas toluene and ethylbenzene biodegradations followed a first-order two-phase kinetic model in all samples. MTBE followed a zero-order removal in all samples. Substrate percent removals ranged from 95.1 - 99.5% for benzene, toluene and ethylbenzene. *O*-

xylene and MTBE removals ranged from 56.0-89.8% and 15.2-30.2% respectively.

**Keywords:** Bioaugmentation, Biodegradation, Bioremediation, BTEX, MTBE.

## Agradecimientos

Esta investigación fue auspiciada por el Instituto Mexicano del Petróleo. Se agradecen los apoyos del fondo SEP-Conacyt, a través del proyecto de investigación C01-47370 y del Paicyt 1295-06 de la UANL.

## Referencias

1. USEPA. (2000). National Water Quality Inventory. 1998 Report to Congress. Groundwater and Drinking Water Chapters. Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA.
2. USEPA. (1997). Fact Sheet. Drinking Water Advisory: Consumer Acceptability Advice and Health Effects Analysis on Methyl Tertiary-Butyl Ether (MTBE). Office of Water. Washington, DC., USA.
3. DOF. (2000). Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994. Salud Ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Diario Oficial de la Federación. Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Salud.
4. Taki, H., Syutsubo, K., Mattison, R.G. and Harayama, S. (2007). Identification and characterization of *o*-xylene-degrading *Rhodococcus* spp. which were dominant species in the remediation of *o*-xylene-contaminated soils. *Biodegradation*, 18(1), 17-26.
5. Di Gennaro, P., Rescalli, E., Galli, E., Sello, G. and Bestetti, G. (2001). Characterization of *Rhodococcus opacus* R7, a strain able to degrade naphthalene and *o*-xylene isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *Res Microbiol.* 152(7), 641-

- 651.
6. Ranjan, R.S., Qian, Y. and Krishnapillai, M. (2006). Effects of electrokinetics and cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide [CTAB] on the hydrocarbon removal and retention from contaminated soils. *Environ Technol.* 27(7), 767-776.
  7. Grimberg, S.J., Stringfellow, W.T. and Aitken, M.D. (1996). Quantifying the biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas stutzeri* P16 in the presence of a nonionic surfactant. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(7), 2387-2392.
  8. Hu, C., Acuna-Askar, K. and Englande, A.J., Jr. (2004). Bioremediation of methyl tertiary-butyl ether (MTBE) by innovative biofilter. *Wat. Sci. Tech.*, 49(1), 87-94.
  9. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1998). 20th edn, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environmental Federation, Washington, DC, USA.
  10. Pruden, A., Sedran, M., Suidan, M. and Venosa, A. (2003). Biodegradation of MTBE and BTEX in an aerobic fluidized bed reactor. *Wat. Sci. Tech.*, 47(9), 123-128.
  11. Acuña-Askar, K., Gracia-Lozano, M.V., Villareal-Chiu, J.F., Marmolejo, J.G., Garza-González, M.T. and Chavez-Gomez, B. (2005). Effect of soil and a nonionic surfactant on BTEoX and MTBE biodegradation kinetics. *Wat. Sci. Tech.* 52(8), 107-115.
  12. Sangster, J. (1998). Octanol-water partition coefficients of simple organic compounds. *J. Phys. Chem. Ref. Data.* 18(3), 1111-1229.
  13. Chang, S.W., La, H.J. and Lee, S.J. (2001). Microbial degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene isomers (BTEX) contaminated groundwater in Korea. *Wat. Sci. Tech.*, 44(7), 165-171.

*Recibido: 17 de agosto de 2007*

*Aceptado: 15 de octubre de 2007*