



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**DEGRADACION DE COMPUESTOS OXIGENADOS
Y ALQUILFENOLICOS BAJO CONDICIONES
ANAEROBIAS**

T E S I S

Que para obtener el grado de

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A

Q. Laura del Carmen Puig Grajales

Dirigida por : Dr. Elías Razo Flores.
 Dr. Oscar Monroy Hermosillo.
 M. en C. Florina Ramírez Vives.

México, D.F.

1999

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin el importante apoyo, tiempo, dedicación y amistad de mis tres supervisores. Gracias al Dr. Elías Razo F., Dr. Oscar Monroy H. y M. en C. Florina Ramírez V.

De igual forma agradezco al Dr. Frédéric Thalasso por dedicar parte de su tiempo a la revisión de este trabajo, sus comentarios fueron valiosos.

Agradezco al Instituto Mexicano del Petróleo por su apoyo económico por medio del programa de becas institucionales para la formación de investigadores y técnicos especialistas para la industria del petróleo. De igual manera al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento otorgado durante la duración de esta maestría.

Al programa red alfa BI-EURAM de la Comunidad Europea que hizo posible una estancia de seis meses en la Universidad de Agricultura de Wageningen, Holanda. Igualmente agradezco al Dr. Jim Field, Nico Tan y Frank van der Zee por su apoyo durante la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Bioprocesos en el IMP y del Laboratorio de Aguas Residuales de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa por la buena disposición para ayudarme en los momentos en que los necesité. Pilar gracias.

Por que los últimos siempre serán los primeros. Rafa, sabes lo especial que eres para mí y te agradezco toda la paciencia y apoyo que me has brindado siempre. Te Amo.

Familia Puig y Familia García, gracias a todos. Los quiero mucho.

Laura

CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN | VII |
| SUMMARY | VIII |
| | |
| Capítulo 1 Introducción | 1 |
| | |
| 1.1 Antecedentes | 2 |
| | |
| 1.2. Características de los compuestos oxigenados y alquilfenólicos | 6 |
| 1.2.1 Compuestos oxigenados | 6 |
| 1.2.2 Compuestos alquilfenólicos | 7 |
| | |
| 1.3 Degradación de los compuestos oxigenados y alquilfenólicos | 9 |
| 1.3.1 Mecanismos de degradación | 10 |
| 1.3.2 Digestión anaerobia | 12 |
| 1.3.2.1 Toxicidad | 16 |
| 1.3.3 Sulfato-reducción | 17 |
| 1.3.4 Desnitrificación | 19 |
| 1.3.5 Fe (III) y Mn (IV) | 22 |
| 1.3.6 Sustancias húmicas | 26 |
| | |
| Capítulo 2 Objetivos e Hipótesis | 28 |
| | |
| 2.1 Objetivo general | 29 |
| 2.1.1 Objetivos específicos | 29 |
| | |
| 2.2 Hipótesis | 30 |
| | |
| Capítulo 3 Materiales y Métodos | 31 |
| | |
| 3.1 Metodologías | 32 |
| 3.1.1 Inóculo | 32 |
| 3.1.2 Medio basal | 32 |
| 3.1.3 Toxicidad anaerobia | 32 |
| 3.1.4 Biodegradabilidad anaerobia | 33 |
| 3.1.5 Preparación del óxido de Mn (IV) y Fe (III) | 34 |

| | | |
|--|---|-----------|
| 3.2 | Métodos analíticos | 35 |
| 3.2.1 | Determinación de los compuestos oxigenados | 35 |
| 3.2.2 | Determinación de los compuestos alquifenólicos | 36 |
| 3.2.3 | Determinación de los iones sulfato y nitrato | 38 |
| 3.2.4 | Determinación de metano | 39 |
| 3.2.5 | Determinación de sólidos suspendidos volátiles | 40 |
| Capítulo 4 Resultados y Discusión | | 41 |
| 4.1 | Compuestos oxigenados | 42 |
| 4.1.1 | Prueba de toxicidad anaerobia | 42 |
| 4.1.2 | Prueba de biodegradabilidad | 43 |
| 4.2 | Compuestos alquifenólicos | 45 |
| 4.2.1 | Prueba de biodegradabilidad | 45 |
| Capítulo 5 Conclusiones y Recomendaciones | | 52 |
| Capítulo 6 Bibliografía | | 56 |
| Anexos | | 62 |
| I | Relaciones estequiométricas de las reacciones de óxido-reducción | 63 |
| II | Metodología empleada para el cálculo del cambio de energía libre de Gibbs | 65 |

INDICE DE TABLAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Tabla 1.1 | Especificaciones de las gasolinas oxigenadas mexicanas. | 4 |
| Tabla 1.2 | Propiedades químicas de algunos compuestos oxigenados. | 7 |
| Tabla 1.3 | Propiedades químicas de algunos compuestos alquilfenólicos. | 8 |
| Tabla 1.4 | Potencial óxido-reducción de diferentes compuestos empleados como aceptores de electrones. | 10 |
| Tabla 1.5 | Concentración de diferentes compuestos fenólicos a la que se inhibe la actividad de las bacterias metanogénicas acetoclásticas en un 50% (CI 50%). | 16 |
| Tabla 1.6 | Reacciones del proceso de desnitrificación. | 20 |
| Tabla 1.7 | Formas de hierro y manganeso presentes en la naturaleza. | 23 |
| Tabla 2.1 | Energía libre de Gibbs (ΔG°) en la oxidación del 2-, 3-, 4-cresol y fenol en diferentes condiciones de óxido-reducción. | 30 |
| Tabla 4.1 | Resultados de la prueba de biodegradabilidad anaerobia de los compuestos oxigenados (1 g/L). | 43 |
| Tabla 4.2 | Resultados de la prueba de biodegradabilidad anaerobia para los compuestos alquilfenólicos (150 mg/L). | 46 |

INDICE DE FIGURAS

| | | |
|----------|--|----|
| Fig. 1.1 | Estructura química de los compuestos oxigenados más utilizados en la producción de gasolinas limpias. | 6 |
| Fig. 1.2 | Estructura química de algunos compuestos alquilfenólicos. | 8 |
| Fig. 1.3 | Esquema de la ruta de degradación anaerobia de compuestos aromáticos. | 11 |
| Fig. 1.4 | Mecanismo de la transformación inicial de la degradación de MTBE. | 11 |
| Fig. 1.5 | Representación del ciclo natural del manganeso y el hierro. | 24 |
| Fig. 1.6 | Esquema del mecanismo de óxido-reducción en presencia de quinonas y óxido de hierro (III) como aceptor de electrones. | 27 |
| Fig. 3.1 | Cromatograma del análisis de TBA. | 36 |
| Fig. 3.2 | Cromatogramas del análisis de los compuestos alquilfenólicos. | 37 |
| Fig. 3.3 | Cromatograma de la determinación de los iones nitrato y sulfato por HPLC. | 38 |
| Fig. 3.4 | Cromatograma de la determinación de metano. | 39 |
| Fig. 4.1 | Comparación de las actividades metanogénicas obtenidas en la prueba de toxicidad de los compuestos oxigenados (1 g/L). | 42 |
| Fig. 4.2 | Perfil de la degradación anaerobia del 2-cresol (A) y 2-etilfenol (B) con Mn (IV) (T1) y Mn (IV)/AQDS (T2) como aceptores de electrones. | 48 |
| Fig. 4.3 | Barridos UV de 2-cresol (A) y 2-etilfenol (B) y los respectivos controles estériles (C y D). Absorbancia al inicio del experimento y a los 23 días. Las muestras fueron diluidas 20 veces con solución amortiguadora de fosfato a pH= 7. | 49 |
| Fig. 4.4 | Efecto inhibitorio de los compuestos AQS y AQDS a sobre la actividad metanogénica acetoclástica. | 51 |

RESUMEN

Puig Grajales, Laura (1999) Degradación de compuestos oxigenados y alquilfenólicos bajo condiciones anaerobias. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México D.F.

El proceso de industrialización ha traído como consecuencia la formación de diferentes productos que permanecen en el ambiente. Dentro de las industrias que generan mayor contaminación ambiental se encuentran la química y petroquímica. Las aguas residuales que provienen de este tipo de industrias son una mezcla de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos. Dentro de los primeros tenemos a los hidrocarburos aromáticos; benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX), hidrocarburos poliaromáticos (PAH) y los compuestos alquilfenólicos. Los alquilfenoles están presentes principalmente en dos corrientes de aguas de proceso, la de sosas gastadas y los condensados fenólicos.

La mayoría de los esfuerzos se han encaminado a la eliminación de estos compuestos tóxicos de las aguas residuales para proteger los cuerpos receptores. Sin embargo, las aguas subterráneas también son un importante recurso, vulnerable a la presencia de muchos contaminantes. A la lista se suman los compuestos oxigenados a partir de su incorporación a las gasolinas limpias. Su presencia ha sido detectada en agua de lluvia, ríos y reservorios de agua potable, junto con compuestos BTEX. Debido a que son compuestos volátiles y muy solubles en agua, se dispersan rápidamente. Tanto los compuestos alquilfenólicos como los oxigenados son tóxicos y representan un riesgo para salud.

La información que existe acerca de la degradabilidad de los compuestos oxigenados y alquilfenólicos en sistemas biológicos anaerobios es escasa. Con el objetivo de obtener mayor información, se seleccionaron al 2-cresol, 2,6-dimetilfenol, 2-etilfenol, metil *tert*-butil éter (MTBE), etil *tert*-butil éter (ETBE), *tert*-amiletil éter (TAME), y *tert*-butil alcohol (TBA), como compuestos modelo para realizar pruebas de biodegradabilidad en lote, con la presencia de diferentes aceptores de electrones. Los compuestos fueron suministrados como única fuente de carbono y energía a concentraciones subtóxicas. Como inóculo se utilizó tanto lodo granular y sedimento anaerobio extraído del río Rhin.

No se observó biodegradación de ninguno de los compuestos oxigenados estudiados después de un periodo de incubación promedio de 80 días, en presencia de diferentes aceptores de electrones. Esto sugiere que la biodegradación de estos compuestos es difícil, por lo que se consideran compuestos recalcitrantes a la biodegradación anaerobia. Esto puede deberse a su estructura química ramificada con un carbono terciario, característica que les provee de una alta estabilidad. No se observó que estos compuestos fueran tóxicos para las bacterias anaerobias a la concentración probada de 1 g/L. Los alquilfenoles también resultaron ser compuestos persistentes a la degradación bajo condiciones de metanogénesis, sulfato-reducción, desnitrificación, reducción de Fe (III) y con el compuesto AQDS como aceptor de electrones. Sin embargo, se obtuvo una mineralización de los compuestos 2-cresol y 2-etilfenol en presencia de Mn (IV) como único aceptor de electrones. Más del 90% de ambos compuestos fue degradado en un periodo menor a 15 días. El compuesto 2,6-dimetilfenol fue degradado abióticamente en presencia de Mn (IV).

SUMMARY

Puig-Grajales Laura (1999) Degradation of gasoline oxygenates and alkylphenolic compounds under anaerobic conditions. MCs thesis. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Mexico City.

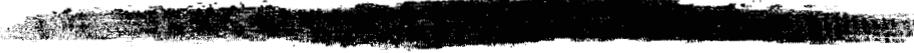
The industrialization process has resulted in the formation of products that remain in the environment. Among the polluting industries are the petrochemical and chemical. The wastewater that comes from this kind of plants is a mixture of inorganic and organic compounds like the aromatic hydrocarbons, (BTEX), PAH and alkylphenols. The alkylphenols are in water streams coming from processes like spend caustic, which is used to wash the oil distillates and phenolic condensates.

The most of the efforts have been directed to the elimination of different toxic compounds from the wastewater streams aiming to protect the surface water. But the groundwater is also important because it is a resource that is vulnerable to a many contaminants. Recently the presence of gasoline oxygenates has been observed in rainwater, lakes, and drinking water supplies together with BTEX compounds. Being volatile compounds and very soluble in water, they get quickly disperse meaning hazard health.

Information on the anaerobic degradation of gasoline oxygenates and alkylphenolic compounds is scarce. To gain more insight on the biodegradability of these compounds, 2-cresol, 2,6-dimethylphenol (2,6-xilenol), 2-ethylphenol, methyl *tert*-butyl ether (MTBE), ethyl *tert*-butyl ether (ETBE), *tert*-amylethyl ether (TAME), and *tert*-butyl alcohol (TBA) were chosen as model compounds, in presence of different electron acceptors, as the only carbon and energy source at subtoxic concentrations. The batch biodegradability study was conducted under methanogenesis, sulfate-, nitrate-, Mn (IV)-, Fe (III)-reduction and also with the model humic compound anthraquinone 2,6-disulfonate (AQDS). Granular sludge and anaerobic Rhine sediment were used as inoculum.

No biodegradation of the gasoline oxygenates was observed after more than 80 days of incubation exposed to different electron acceptors. These results suggest that the biodegradation of these ethers is not easy and the product formed TBA, also persists under anaerobic conditions. The reason why these compounds are persistent could be related to their branched molecular structure with a tertiary carbon, provide them a high chemical stability. There was not evidence of toxicity for the anaerobic bacteria at the concentration tested. The alkylphenols were not biodegradable after 100 days of incubation under the traditional anaerobic conditions. However, the biodegradation of 2-cresol and 2-ethylphenol was observed in presence of Mn (IV) as electron acceptor. The biodegradation of these two compounds took place in less than 15 days. More than 90% of biodegradation was observed for both compounds and UV metabolites were not detected after 23 days of incubation under Mn (IV)-reductive conditions. 2,6- dimethylphenol was consumed abiotically by chemical reaction with the Mn (IV)-oxide present in the system.

Capítulo 1



INTRODUCCION

1.1 Antecedentes

La industria del petróleo representa una de las principales fuentes de ingresos, de la cual depende en una gran parte la economía mundial. Sin embargo el proceso de industrialización, en la rama de productos químicos y petroquímicos, ha dado como resultado no únicamente beneficios económicos sino también la formación de sustancias que se mantienen en el ambiente. Estos compuestos generan contaminación ambiental en sus diferentes formas, ya sea por medio de emisiones, residuos sólidos y aguas residuales, provocando un continuo deterioro de la flora y fauna de los ecosistemas, así como de la salud pública (Razo-Flores, 1997).

En la industria de derivados del petróleo, el agua se utiliza como materia prima; como un medio de producción (agua de proceso) y para propósitos de enfriamiento. El agua de desecho proveniente de los procesos de producción se denomina agua residual industrial y se caracteriza por tener un caudal y composición variables en diferentes épocas del año y una alta concentración de contaminantes; compuestos tóxicos y persistentes. La disposición de las aguas residuales industriales del territorio de las plantas se realiza por diferentes métodos; descarga a cuerpos receptores superficiales, descarga al alcantarillado municipal, utilización agrícola o bien, pueden ser reutilizadas en la misma industria, siempre y cuando reúnan los criterios de calidad para asegurar la protección de estos sistemas (Mijaylova, 1993). Desde hace más de quince años que los gobiernos e industrias aceptaron la estrategia de prever y controlar la contaminación, el mayor esfuerzo se ha dirigido al tratamiento de aguas residuales (municipales e industriales) y la eliminación de diferentes compuestos tóxicos de los efluentes, con el fin de proteger los principales cuerpos receptores superficiales.

Las aguas residuales que provienen de este tipo de industrias es una mezcla de compuestos tanto inorgánicos como orgánicos, incluyendo a los hidrocarburos aromáticos (Blum *et al.*, 1986). Estos últimos se dividen en dos grandes grupos; los compuestos monocíclicos como el benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX), los compuestos alquilfenólicos y los hidrocarburos poliaromáticos (PAH), por ejemplo naftaleno, antraceno y fenantreno (Holliger y Zehnder, 1996).

En el caso de la industria de derivados del petróleo los compuestos fenólicos provienen de procesos de desintegración, principalmente. La concentración de estos compuestos está en el rango de 2 a 10 g/L, donde el 25% es fenol y alrededor del 10% son compuestos alquilfenólicos como; cresoles, xilenoles y etilfenoles. Dos corrientes contienen compuestos fenólicos; la de sosas gastadas y los condensados fenólicos. Pocos datos existen sobre la concentración de este tipo de compuestos en las aguas residuales provenientes de las refinerías mexicanas sin embargo, considerando que la producción anual de diferentes productos derivados del petróleo alcanzó un valor de 1, 605.9 miles de barriles por día (Mbd) en el año de 1998, esto es un indicativo de que la presencia de los compuestos fenólicos en el agua pudiera alcanzar valores elevados.

No sólo las aguas superficiales necesitan ser protegidas, las aguas subterráneas también son un importante recurso, vulnerable a mecanismos de solubilización y difusión, que provocan la infiltración de diferentes contaminantes y la lista de estos sigue en aumento, con la introducción de las gasolinas limpias u oxigenadas. En 1980 las gasolinas eran un complejo de hidrocarburos incluyendo alcanos, cicloalcanos y aromáticos. A partir de 1990, como resultado de una iniciativa de la Agencia de Protección Ambiental (EPA) en Estados Unidos, descrita en el Acta de Aire Limpio, se declara como obligatoria la introducción a las gasolinas del 2.7% en peso de oxígeno, es decir 14. 8% en volumen de metil *tert*-butil éter (MTBE), con el principal objetivo de ayudar a disminuir los niveles de monóxido de carbono en el aire generado por las emisiones de automotores (Reuter *et al.*, 1998). El consumo de este tipo de gasolinas aumenta cada día y se estima que el uso de compuestos oxigenados, principalmente MTBE, puede incrementarse de 70 Mbd consumidos en 1995 a 100 Mbd (Nakamura, 1995). El MTBE no es el único compuesto que se utiliza en la producción de este tipo de gasolinas, también se emplean los compuestos como el etil *tert*-butil éter (ETBE), *tert*-amil metil éter (TAME), *ter*-butanol (TBA), así como el etanol. En México las gasolinas oxigenadas son utilizadas desde 1990, con la introducción de la gasolina MAGNA-SIN.

Actualmente se emplean dos tipos diferentes de gasolinas oxigenadas en México y sus especificaciones se muestran en la Tabla 1.1. El año pasado las ventas de estas gasolinas alcanzaron 14.48 millones de metros cúbicos por día, contabilizando 36, 924.3 millones de pesos (PEMEX, 1998).

Tabla 1.1 Especificaciones de las gasolinas oxigenadas mexicanas.

| Especificaciones | MAGNA-SIN | PEMEX-MAGNA |
|-----------------------------|------------------|--------------------|
| Oxígeno (%-peso) | 1-2 | 1-2 |
| Azufre (contenido máx. ppm) | 1000 | 500 |
| Octano (mínimo) | 87 | 87 |
| Aromáticos (%-vol) | 30 | 25 |
| Olefinas (%-vol) | 15 | 10 |
| Benceno (%-vol) | 2 | 1 |

Recientemente, el interés por los compuestos oxigenados ha ido en aumento ya que se ha detectado su presencia en lagos, ríos y pozos que proveen de agua potable a ciudades importantes en Estados Unidos de America (E.U.A.). Derrames directos de gasolinas o bien, derrames de los compuestos durante su almacenamiento y distribución, son la principal causa de su presencia en el agua. En E.U.A en el año de 1994 se estimó que 1.5 millones de kilogramos de MTBE fueron derramados (EPA, 1997). En cada derrame cerca del 97% se queda en el aire y menos del 3% se descarga en el agua sin embargo, debido a la lluvia y el deshielo, estos compuestos altamente solubles se dispersan infiltrándose a las corrientes subterráneas Un reporte reciente del Geological Survey declara al MTBE como el segundo compuesto tóxico más frecuentemente encontrado en acuíferos en E.U.A. (Steffan, 1997). Otro estudio realizado en diferentes ciudades de E.U.A. muestra que el 66% de las muestras de agua de lluvia obtenidas presentó MTBE (0.2–8.7 $\mu\text{g/L}$), seguido de compuestos BTEX como tolueno, xileno y trimetilbenceno (Delzer *et al.*, 1997).

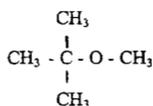
El principal problema de tener presente este tipo de compuestos en el agua es que se trata de compuestos químicos clasificados como sustancias peligrosas y carcinogénicas, representando un riesgo para la salud pública. En el caso de los compuestos alquilfenólicos, su toxicidad es similar a la de los compuestos nitroaromáticos y clorofenoles (Klibanov, 1980; Verschueren, 1977; Donlon *et al.*, 1995). La toxicidad de los compuestos oxigenados está en debate (Stern y Kneiss, 1997; CONCAWE, 1997). La mayoría de los estudios concernientes a la toxicidad de estos compuestos está dirigida a los efectos provocados por su inhalación. Estudios realizados a nivel de laboratorio con animales y voluntarios mostraron que la exposición a 75 ppm de MTBE durante 3 horas genera afecciones en mucosas, dolores de cabeza y náuseas (CONCAWE, 1997). No existe mucha evidencia sobre los efectos que puedan provocar estos compuestos por ingestión en humanos, pero sí es muy importante resaltar que el metabolismo del MTBE en el cuerpo humano puede generar compuestos como TBA y formaldehído, este último clasificado por la Agencia de Protección Ambiental de E.U.A.(EPA, por sus siglas en inglés) como un compuesto probablemente carcinogénico y mutagénico para los humanos (EPA, 1997; CONCAWE, 1997). Actualmente el MTBE se encuentra incluido en la lista de prioridades para ser regulado por la National Primary Drinking Water Regulation de los E.U.A. El nivel máximo de MTBE en agua para beber sugerido es de 100 µg/L, basándose en los antecedentes de ser un potencial cancerígeno (Acuña-Askar, 1998).

1.2 Características de los compuestos oxigenados y alquilfenólicos

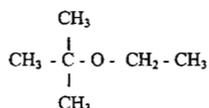
1.2.1 Compuestos oxigenados

Químicamente, son compuestos denominados éteres, es decir, son hidrocarburos con una molécula de oxígeno insertada dentro de su ramificada cadena carbonada, como se muestra en la Figura 1.1. Compuestos líquidos, incoloros y de olor agradable, especialmente los aromáticos, son muy volátiles e inflamables. Los éteres son compuestos considerados muy estables, mucho menos reactivos que los alcoholes, por lo que en este aspecto se parecen a los alcanos sin embargo, su enlace con el oxígeno los hace más propensos a la acción de reactivos electrofílicos. La hidrólisis de un éter es relativamente difícil y se logra químicamente por la ebullición prolongada con ácido sulfúrico. Industrialmente se preparan a partir de la deshidratación de los alcoholes.

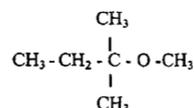
MTBE



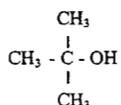
ETBE



TAME



TBA



ETANOL



Fig. 1.1 Estructura química de los compuestos oxigenados más utilizados en la producción de gasolinas limpias.

Las propiedades químicas más importantes de estos compuestos se encuentran descritas en la Tabla 1.2, que a continuación se muestra:

Tabla 1.2 Propiedades químicas de algunos compuestos oxigenados.

| Propiedad | MTBE | ETBE | TAME | TBA |
|---|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Peso molecular (g/mol) | 88.15 | 102.18 | 102.18 | 74.12 |
| Fórmula molecular | C ₅ H ₁₂ O | C ₆ H ₁₄ O | C ₆ H ₁₄ O | C ₄ H ₁₀ O |
| P _e (°C) | 102 | 72.2 | 86.3 | 82.4 |
| Densidad de vapor | 3.1 | 3.6 | 3.6 | 2.6 |
| Presión de vapor (mmHg) | 240 | 130 | 75 | 74.12 |
| Densidad (g/mL) | 0.74 | 0.77 | 0.77 | 0.79 |
| Solubilidad en agua (g/100 g) | 4.8 | 1.2 | 1.2 | miscible |
| Cte. de Henry (Atm·m ³ /g·mol) | 5.28E-4 | 2.64E-3 | 1.95E-3 | 1.21E-5 |

1.2.2 Compuestos alquilfenólicos

Compuestos químicos que derivan de los hidrocarburos aromáticos como el fenol y se encuentran sustituidos por uno o varios grupos alquilo. Las regiones de gran densidad electrónica son las posiciones *orto*, *meta* y *para*, con relación a la posición del fenol, lo que orienta hacia estas posiciones a los sustituyentes electrofílicos. Químicamente son compuestos muy similares al fenol, caracterizado por la influencia del grupo hidroxilo y su estructura aromática. Compuestos medianamente ácidos, forman sales con metales, como el sodio y el potasio, solubles en agua. Su grupo hidroxilo les imparte una gran reactividad, principalmente para reacciones de sustitución con halógenos, nitrato o con ácido sulfúrico.

Son compuestos rápidamente oxidables formándose como producto quinonas e hidroquinonas y ácidos hidroxibenzoicos, dependiendo del agente oxidante que se utilice. Algunos de los compuestos alquilfenólicos importantes son los cresoles, xilenoles (dimetilfenoles) y etilfenoles. Las estructuras químicas se muestran en la Figura 1.2.

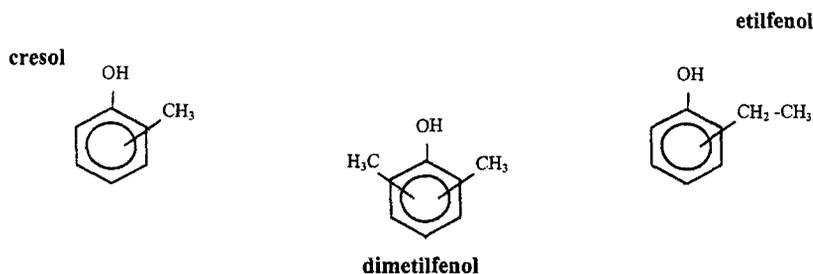


Fig. 1.2 Estructura química de algunos compuestos alquilfenólicos.

Las propiedades químicas importantes de estos compuestos se presentan a continuación en la Tabla 1.3.

Tabla 1.3 Propiedades químicas de algunos compuestos alquilfenólicos (Aldrich, 1998).

| Propiedad | 2-cresol | 3-cresol | 4-cresol | 2,6-dimetilfenol | 2-etilfenol |
|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Peso molecular (g/mol) | 108 | 108 | 108 | 122.17 | 122.17 |
| Fórmula molecular | C ₇ H ₈ O | C ₇ H ₈ O | C ₇ H ₈ O | C ₈ H ₁₀ O | C ₈ H ₁₀ O |
| P _f (°C) | 30.99 | 12.22 | 34.69 | 44-46 | -18 |
| P _c (°C) | 191 | 202.2 | 201.9 | 203 | 206 |
| Densidad (g/mL) | 1.04 | 1.0341 | 1.0341 | 1.01 | 1.017-1.019 |
| Solubilidad (g/100 mL de agua) | menos de 0.1 (19 °C) | 1-5 (20 °C) | menos de 0.1 (21 °C) | 10 g/L | no miscible |

1.3 Degradación anaerobia de los compuestos oxigenados y alquilfenólicos

La industria petroquímica o de derivados del petróleo genera descargas con altas concentraciones de compuestos oxigenados y alquilfenólicos, por lo que se ven en la necesidad de aplicar algún tipo de tratamiento. Por lo general se utilizan métodos físicos y químicos sin embargo, estos presentan inconvenientes como su alto costo, en algunas ocasiones no tienen ningún efecto o no logran una eliminación completa, generando compuestos residuales más o igualmente tóxicos, donde es necesario emplear un segundo tratamiento (Ruskin *et al.*, 1992). Ante esta problemática los tratamientos biológicos, aerobios o anaerobios, representan una buena alternativa (Young y Rivera, 1985).

Durante los tratamientos biológicos los compuestos orgánicos contaminantes son removidos por medio de una conversión a nivel celular dando como resultado, generalmente, productos de mineralización. La mayor ventaja que ofrecen estos sistemas es su alta eficacia para remover materia orgánica disuelta y más aún, la remoción de compuestos tóxicos (Kortekaas, 1998).

La degradación de compuestos tóxicos es diferente en el caso de ambientes aerobios y anaerobios. Los microorganismos aerobios utilizan al oxígeno como aceptor final de electrones. La degradación aerobia de los compuestos fenólicos ha sido documentada ampliamente (Heider y Fuchs, 1997; Blum *et al.*, 1986, Kettunen *et al.*, 1996; Banerjee, 1997). El mecanismo de degradación aerobia de los compuestos aromáticos para la mayoría de los microorganismos sigue un mecanismo en común, donde intervienen enzimas oxigenasas que preparan al sustrato para la fisión del anillo bencénico, con la adición de grupos hidroxilo que se sustituyen en el núcleo aromático. Subsecuentemente, otra oxigenasa cataliza la apertura del anillo bencénico hidroxilado, creando un compuesto alifático más sencillo (Smith, 1990; Villemur, 1995).

Algunos datos existen de la degradación aerobia de los compuestos oxigenados en sistemas aerobios, estos sugieren como mecanismo de degradación la formación del compuesto TBA y *ter*-butil-formato (TBF). Reportes señalan que el MTBE sólo es capaz de ser degradado en presencia de un costratos tal como propano y butano (Hyman y O'Reilly, 1998).

En el caso de ambientes contaminados donde el oxígeno no está presente, los microorganismos pueden utilizar compuestos inorgánicos como nitrato, sulfato, dióxido de carbono, manganeso (IV) y fierro (III) como aceptores de electrones (Langenhoff, 1997; Holliger y Zehnder, 1996). La degradación anaerobia de diferentes compuestos tóxicos se ha estudiado bajo diferentes condiciones de óxido-reducción, donde las bacterias anaerobias dependen del uso de aceptores de electrones con altos potenciales redox. Estos valores se describen en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4 Potencial óxido-reducción de diferentes compuestos empleados como aceptores de electrones (Nealson y Myres, 1992).

| Aceptor de electrones | Reacción | E_0 (mV) |
|-----------------------|-------------------|------------|
| Oxígeno | O_2/H_2O | + 820 |
| Fe (III) soluble | Fe^{+3}/Fe^{+2} | + 770 |
| Nitrato | NO_3^-/NO_2^- | + 430 |
| Mn (IV) | MnO_2/Mn^{+2} | + 380 |
| Nitrito | NO_2^-/NO | + 350 |
| Sulfito | HSO_3^-/HS^- | - 110 |
| Sulfato | SO_4^{2-}/HS^- | - 230 |
| Dióxido de carbono | CO_2/CH_4 | - 240 |

1.3.1 Mecanismos de degradación

Los mecanismos de degradación de los compuestos aromáticos se han estudiado bajo condiciones de sulfato-reducción y desnitrificación, los primeros reportes datan de 1944 y 1969 (Holliger y Zehnder, 1996). En la Figura 1.3. se esquematiza la ruta anaerobia de degradación de estos compuestos, donde se muestra que los diferentes compuestos aromáticos son transformados a intermediarios centrales como benzoil-CoA. Posteriormente, se lleva a cabo una reducción de los

compuestos alicíclicos, el anillo es abierto por medio de una hidrólisis y los productos no cíclicos son transformados a metabolitos centrales como el acetyl-CoA (Holliger y Zehnder, 1996).

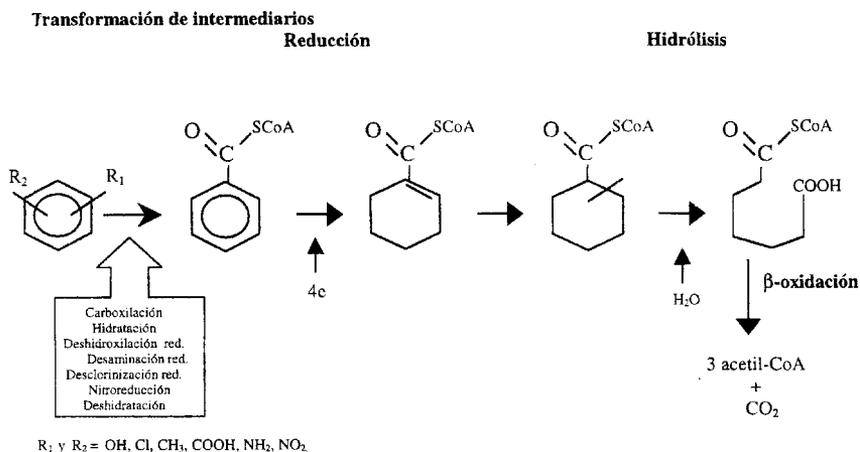


Fig. 1.3 Esquema de la ruta de degradación anaerobia de compuestos aromáticos (Holliger y Zehnder, 1996)

Para los compuestos oxigenados los reportes señalan que la degradación del MTBE envuelve un aparente incremento de la concentración de TBA. Esto sugiere que el MTBE comienza a metabolizarse cuando el enlace éter se rompe, siendo este el primer paso y el limitante, ya que ocurre lentamente, como se muestra en la Fig. 1.4 (Mormille *et al.*, 1994; Clinton *et al.*, 1997). El TBA puede ser transformado a acetona, 2-propanol, formato y por último a dióxido de carbono (Clinton *et al.*, 1997).

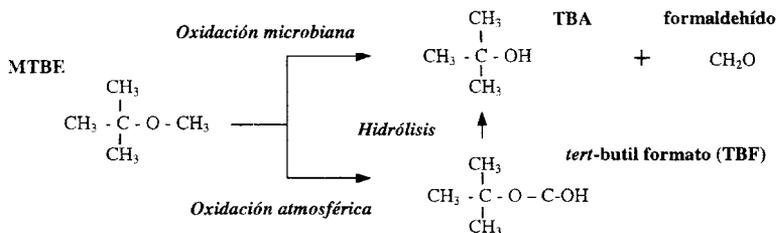


Fig. 1.4 Mecanismo de la transformación inicial de la degradación de MTBE (Clinton *et al.*, 1997).

1.3.2 Digestión anaerobia

El principio básico de la digestión anaerobia consiste en la transformación de la materia orgánica en biogas, que contiene principalmente metano y dióxido de carbono. La digestión anaerobia se lleva a cabo en diferentes etapas. La primera de ellas es la hidrólisis, que consiste en la licuefacción de materia orgánica compleja. Los carbohidratos, proteínas, lípidos, etc., son hidrolizados a azúcares monoméricos, aminoácidos y ácidos grasos de cadena larga. La acidogénesis, como segunda etapa, consiste en la transformación de compuestos solubles, generados en la primera etapa, a dióxido de carbono, hidrógeno y ácidos grasos volátiles. También se obtienen pequeñas cantidades de etanol y ácido láctico. Los ácidos grasos de cadenas largas se oxidan rindiendo ácidos grasos de cadena corta como el acetato. Mediante la acetogénesis los ácidos grasos volátiles formados en la acidogénesis rinden acetato, hidrógeno, y dependiendo del número de carbono de las cadenas de los ácidos grasos, puede generarse dióxido de carbono. La metanogénesis, es la última etapa de la digestión anaerobia que permite la formación de metano por descarboxilación del acetato, gracias a la presencia de bacterias metanogénicas acetotróficas, y por hidrogenación del dióxido de carbono por bacterias metanogénicas hidrogenotróficas (Soube, 1994).

En un sistema anaerobio coexisten un gran número de bacterias y la microflora puede ser tan diversa como en el caso del rúmen, donde se han identificado en un sólo estudio más de 130 especies diferentes que mantienen interacciones muy estrechas. Para hacer una clasificación de todas las bacterias que intervienen, se puede tomar como criterio principal a la concentración de hidrógeno ya que juega un papel muy importante en el flujo de carbono. En esta clasificación se pueden distinguir dos grandes grupos, las bacterias productoras y consumidoras de hidrógeno (Soube, 1994):

Grupo I. Bacterias productoras de hidrógeno

1. Bacterias hidrolíticas y fermentativas: integran este grupo bacterias aerobias facultativas como las enterobacterias, bacterias del ácido láctico y bacterias anaerobias estrictas como *Clostridium*, *Bacteroides*, *Propionibacterium* y *Selenomonas*.

2. Bacterias acetogénicas reductoras: microorganismos sintróficos con las metanogénicas hidrogenotróficas o las bacterias sulfato-reductoras. Algunas son *Syntrophobacter wolinii* o *Syntrophomonas wolfei*.
3. Bacterias sulfato-reductoras (BSR)

Grupo II. Bacterias consumidoras de hidrógeno

1. Bacterias homoacetogénicas: bacterias fermentativas que se caracterizan por la producción de acetato exclusivamente. Son un grupo muy diverso y dentro de las más importantes se encuentran *Clostridium*, *Acetobacterium*, *Peptococcus*, *Eubacterium*, *Acetogenium*.
2. Bacterias metanogénicas: pertenecen al reino de las Arquibacterias o archae. Tienen la característica de ser capaces de formar metano y por lo tanto tienen enzimas exclusivas como hidrogenasas con diferentes cofactores F₂₄₀ y F₄₃₀ y coenzima M. Requieren de cofactores como Ni, Fe, Co y Se. También presentan una diferencia en los componentes de los lípidos de la membrana, está constituida por éteres de fitanol y bifitanol y no poseen mureína en su pared. De acuerdo a los sustratos que degradan se dividen en: hidrogenotróficas, bacterias capaces de producir metano a partir de hidrógeno y dióxido de carbono; acetoclásticas, que emplean acetato y las metilotróficas (hidrógeno-metilotróficas y alcoholotróficas) que metabolizan compuestos como metilaminas y metilsulfuros. De entre las metanobacterias hidrogenotróficas más frecuentes se encuentran *Methanobacterium*, *Methanospirillum* y *Methanobrevibacter*. El 60% del carbono se degrada vía acetato y los géneros principales son *Methanosarcina* y *Methanothrix* (Guyot, 1992).

En los últimos años ha crecido la posibilidad de destoxificar compuestos aromáticos bajo condiciones metanogénicas y se ha demostrado que la mineralización de este tipo de compuestos a dióxido de carbono y metano es posible. Hay reportes sobre la degradación metanogénica de tolueno, benceno, estireno, naftaleno, aminobenzoato y aminofenoles (Smith, 1990; Donlon *et al.*, 1995; Borden, 1994; Langenhoff, 1997). La biodegradabilidad del fenol se ha evaluado con mayor frecuencia vía metanogénesis, los resultados obtenidos en varios estudios muestran que es

completamente mineralizado a metano y dióxido de carbon, en periodos cortos de tiempo (Blum *et al.*, 1986; Fedorak y Hudrey, 1984; Razo *et al.*, 1996). De igual manera, los compuestos fenólicos como el catecol y el ácido benzoico a una concentración de 300 mg/L, son mineralizados a dióxido de carbono y metano por un lodo granular proveniente de un reactor anaerobio a nivel laboratorio (Healy y Young, 1978). Otros reportes señalan que es posible mineralizar concentraciones de entre 500 y 1000 mg/L de los compuestos fenol, catecol y resorcinol en un reactor de tanque agitado en continuo empleando como inóculo un cultivo enriquecido con acetato. Se tienen pocos datos sobre la mineralización vía metanogénesis de los compuestos alquilfenólicos. Fedorak y Hudrey (1984) reportaron que compuestos como el 2,5-, 3,4- y 3,5-dimetilfenol a una concentración de 300 mg/L, no son mineralizados a metano, inclusive, una concentración de 500 mg/L de estos compuestos resultó inhibitoria para las bacterias metanogénicas. Sin embargo, el fenol y el 4-cresol fueron transformados a metano a concentraciones 500 y 200 mg/L, respectivamente. Estas pruebas se realizaron en lote, a 37 °C, empleando como inóculo un lodo proveniente del tratamiento de aguas domésticas. En otro reporte se señala que 250 mg/L de 4-cresol y 300 mg/L de fenol son mineralizados a metano por lodos granulados provenientes de 5 diferentes fuentes. Las fases de retardo observadas no rebasaron los 19 días para el 4-cresol y 40 para el fenol, observándose una producción teórica total de metano mayor al 77% (Razo *et al.*, 1997). Blum *et al.* (1986) concluyó que compuestos como el 2-cresol, 3,4-xilenol, 2,3-xilenol, 3-etilfenol, ácido hexanoico y 4-etilpiridina no son mineralizados vía metanogénica a diferencia de compuestos como catecol, fenol, resorcinol y 4-cresol que sí fueron degradados. En este estudio de biodegradabilidad en lote, Blum *et al.* (1986) examinó una mezcla de 12 compuestos fenólicos a concentraciones mayores o iguales a 100 mg/L y 15 compuestos a concentraciones menores de 100 mg/L, con el empleo de un lodo proveniente de un digestor anaerobio aclimatado a fenol y ácido acético como inóculo, durante un periodo de entre 28 a 35 semanas. Bisailon *et al.* (1991) reportó que el 2-cresol es transformado a los 60 días en ácido 3-metilbenzoico por un consorcio degradador de fenol, este intermediario no fue metabolizado a pesar de prolongar el periodo de incubación a 29 °C por más de 120 días. En el caso del 3-cresol, Battersby y Wilson (1989) señalan que es parcialmente degradado después de un periodo de incubación de 40 días, obteniéndose menos del 80% de la producción teórica de metano. Durante este estudio se examinó la biodegradabilidad anaerobia en lote a 35 °C, utilizando un lodo proveniente de un digestor primario receptor de una mezcla de aguas residuales domésticas e industriales.

Para los compuestos oxigenados pocos reportes son los que se refieren a su degradación bajo condiciones anaerobias y los que existen, en su mayoría, se enfocan a la degradación vía metanogénesis. Para el MTBE, TAME, ETBE y TBA Suflita y Mormille (1993) determinaron que son compuestos persistentes a ser degradados bajo condiciones anaerobias, durante un periodo mayor a 182 días. Este estudio se realizó en lote, con el uso de una mezcla de sedimentos anaerobios y muestras de agua subterránea colectados de un lugar contaminado y con una concentración inicial de 50 ppm de cada uno de los compuestos probados. Compuestos como cetonas, alcoholes y ésteres fueron examinados dando resultados positivos de mineralización. Dentro de este reporte se resalta la importancia y el papel que juega la estructura química de los compuestos en la capacidad de ser biodegradados por sistemas biológicos. Otro estudio realizado en microcosmos con el uso de diferentes sedimentos extraídos a varias profundidades y con diferentes concentraciones de materia orgánica, mostró que compuestos como el MTBE y el TAME no son biodegradables en un periodo de incubación mayor a 250 días, en ninguno de los sistemas evaluados (Yeh y Novak, 1994). En el caso del ETBE sí se presentó degradación cuando se utilizó un suelo con muy baja concentración de materia orgánica (Yeh y Novak, 1994). Un reporte de Kang *et al.* (1998) presenta la comparación entre la degradación aerobia y anaerobia del compuesto MTBE, empleando como inóculo un suelo de un sitio contaminado por combustibles. Después de 150 días de incubación en condiciones aerobias no se obtuvieron resultados positivos, no así en ausencia de oxígeno, donde se obtuvo un 76% de remoción de MTBE, produciéndose TBA como intermediario. Pocos documentos, como éste, ponen en evidencia la degradación de los compuestos oxigenados bajo condiciones anaerobias. En el mismo sentido, se considera importante el reporte sobre la atenuación natural en un sitio expuesto por más de 49 años al almacenamiento de tanques de reserva de combustibles. En este estudio los resultados muestran que, en una zona de 800 acres, los niveles de MTBE (215 ug/L) han disminuido dando como respuesta el incremento en la concentración de TBA (1770 ug/L). Así mismo, se detectó una alta producción de metano, lo cual indicó que la biodegradación se llevó a cabo vía metanogénesis (Hurt *et al.*, 1998).

1.3.2.1 Toxicidad

El principal problema a confrontar en el tratamiento anaerobio de aguas residuales con compuestos fenólicos, son las altas concentraciones de estos compuestos, que en la mayoría de los casos son inhibitorias para los microorganismos. Se ha observado una inhibición de los compuestos fenólicos hacia las bacterias metanogénicas a concentraciones de 250 a 3000 mg/L. La naturaleza inhibitoria de los fenoles monoméricos está relacionada a la no polaridad de estos compuestos. De entre los compuestos aromáticos el fenol es de los menos tóxicos, la toxicidad aumenta si se incrementa la cantidad de grupos alquil o cloro sustituidos (Tabla 1.5). Al ser compuestos no polares tienen la capacidad de lograr una solubilidad parcial en las membranas de las bacterias, lo cual daña las funciones de la misma, así como el transporte de iones y ocasionalmente producen lisis celular (Field y Lettinga, 1987; Sierra y Lettinga, 1991; Donlon *et al.*, 1995).

Tabla 1.5 Concentración de diferentes compuestos fenólicos a la que se inhibe la actividad de las bacterias metanogénicas acetoclásticas en un 50% (CI 50%).

| Polaridad | Compuesto | CI 50 % ^a (mg/L) | Sustituyentes | Ref. |
|-----------|-----------|--------------------------------|---------------------------------------|---|
| + | Pirogalol | 3000 | 3 grupos OH | 1 |
| ↓ | Catecol | 1800 | 2 grupos OH | 2 |
| | Fenol | 1100 | 1 grupo OH | 2 |
| | 4-cresol | 570 | 1 grupo OH 1 grupo CH ₃ | 2 |
| | - | Etilfenol | 260 | 1 grupo OH 1 grupo CH ₂ CH ₃ |

¹ Field y Lettinga, 1987.

² Sierra y Lettinga, 1991.

1.3.3 Sulfato-reducción

El azufre es un elemento esencial en la biosfera y alrededor del 1% de cualquier organismo está constituido por este elemento. Su importancia radica en que estabiliza proteínas y ayuda a la transferencia de hidrógeno por enzimas óxido-reductoras. En la naturaleza, el azufre es localizado en diferentes estados de oxidación siendo -2, 0 y +6 los más comunes, representados por sulfuros, azufre elemental y sulfatos, respectivamente. A excepción de los animales y humanos, la mayoría de plantas, hongos y bacterias son capaces de transformar, por medio de la reducción de sulfatos a sulfuro, realizando la biosíntesis de componentes celulares que contengan azufre (Fischer, 1984). Sin embargo, sólo un grupo de bacterias pueden producir energía para su crecimiento por medio del metabolismo del azufre (desasimilación) y estas son las bacterias sulfato-reductoras (BSR). Estos organismos son capaces de oxidar los compuestos orgánicos y transferir los electrones liberados al sulfato como aceptor final de electrones, generando como principal producto sulfuro de hidrógeno. A este proceso biológico que forma parte del ciclo del azufre se le denomina sulfato-reducción (Lutz, 1996). La reacción es la siguiente:



Dentro del tratamiento anaerobio de aguas residuales, adicionalmente a la metanogénesis, la sulfato-reducción ocurre si existe la presencia de sulfato, estableciéndose una competencia entre las BSR y las bacterias metanogénicas por el uso de acetato e hidrógeno (al final del segundo paso en el proceso de mineralización).

Las BSR están distribuidas en medios acuáticos, terrestres, sitios contaminados, pozos, gas natural, depósitos de azufre, etc., pudiéndose encontrar cepas psicofílicas, mesofílicas, termofílicas y halófilas. Es un grupo morfológicamente muy diferente a las bacterias anaerobias. Pfenning *et al.* (1981) hace una clasificación de las BSR de acuerdo a su metabolismo; el primer grupo oxida de manera incompleta su sustrato (la mayoría pueden utilizar lactato y etanol), el segundo realiza la oxidación de acetato, succinato y piruvato a dióxido de carbono (Fischer, 1984; Visser, 1995). También pueden encontrarse algunas cepas autotróficas, que usan al dióxido de carbono como fuente de carbono. Las BSR son anaerobias obligadas, sin embargo, pueden

sobrevivir a la exposición temporal del oxígeno (0.1-1 mg/L). La temperatura óptima para la mayoría de las BSR está en el rango de 28-32 °C, sin embargo, hay evidencias de la existencia de cepas que tienen un crecimiento a más de 60 °C. El pH ambiental más favorable para este proceso se encuentra alrededor de 7, a pH menores de 5.5 o mayores de 9 se inhibe el proceso (Hao *et al.*, 1996). Dentro de las sustancias que pueden llegar a inhibir la sulfato-reducción se encuentra el sulfuro. La concentración inhibitoria puede variar dependiendo de la población, aunque algunos datos indican que concentraciones de entre 193 y 230 mg/L de H₂S a pH neutro inhiben casi completamente a la población de BSR (Hao *et al.*, 1996). Sin embargo, algunas bacterias como *Desulfovibrio* toleran la presencia de 547 mg/L de sulfuro (Hao *et al.*, 1996). Los metales en su forma libre también generan un efecto tóxico en las BSR, principalmente el fierro, selenio y molibdato (Hao *et al.*, 1996).

Las BSR son microorganismos que tienen la capacidad de degradar un amplio rango de compuestos aromáticos. La familia *Desulfobacteriaceae* abarca a la mayoría de las bacterias que degradan este tipo de compuestos. Particularmente, *Desulfobacterium (Db) anilini* degrada anilina y fenol; el 4-cresol así como el fenol son degradados por *Db. Phenolicum*; *Db. catecholum* y *Db. indolicum* utilizan catecol e indol, respectivamente. Al igual que sucede para la metanogénesis, los compuestos que han sido sometidos a estudio bajo condiciones de sulfatoreducción, son el fenol y los cresoles, compuestos alquifenólicos de estructura sencilla. Haggblom y Young (1995) reportaron la completa mineralización a dióxido de carbono del fenol, se lleva a cabo en un periodo menor a 6 días en presencia de 10 mM de sulfato como aceptor de electrones, empleando como inóculo un sedimento expuesto por varios años a la presencia de compuestos fenólicos halogenados. Con respecto a los cresoles, se tiene evidencia de que son degradados bajo condiciones de sulfato-reducción, sin embargo, la ruta metabólica anaerobia es dependiente de la posición en que se encuentre sustituido el grupo metilo en el anillo aromático (Ramanand y Suflita, 1991; Heider y Fuchs, 1997). El 4-cresol es degradado vía oxidación del grupo metilo, formando como intermediario al ácido 4-hidroxibenzoico. Este intermediario es posteriormente convertido a ácido benzoico y el grupo metilo liberado es oxidado a dióxido de carbono (Suflita *et al.*, 1989; Heider y Fuchs, 1997). Los compuestos 3- y 2-cresol tienen un mecanismo de degradación anaerobio, realizado por las BSR o bien metanogénicas, un tanto diferente. En ambos casos es iniciado por una reacción de carboxilación, del 3-cresol se produce como intermediario el

2-metil-4-hidroxibenzoato, a partir del cual se obtiene al compuesto 4-hidroxibenzoato, por una reacción de desmetilación (Heider y Fuchs, 1997). El grupo metilo se cree, es oxidado a metano (Suffita *et al.*, 1989).

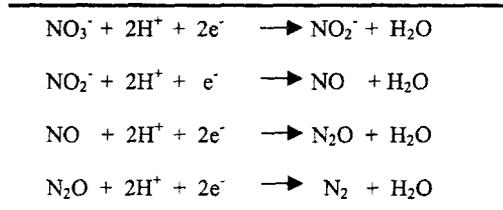
Sobre el mecanismo de degradación del compuesto 2-cresol existen algunas controversias, algunos reportes indican que posteriormente a la reacción inicial de descarboxilación uno de los intermediario es el 3-metilCoA, a partir del cual, el grupo metilo es eliminado para ser oxidado o bien, se elimina durante la apertura del anillo. En otro estudio se observó la presencia de ácido benzoico, como intermediario de la biodegradación del 2-cresol vía sulfato-reducción, lo cual sugiere que el mecanismo vía oxidación del grupo metilo es el predominante, al igual que para el 4-cresol. Sin embargo, la degradación del 3- y 4-cresol se inició a los 11 días, mientras que el 2-cresol presentó una etapa de retardo de 60 días, siendo este último el más persistente y el 4-cresol el más susceptible. Estos resultados se obtuvieron con el empleo de un cultivo enriquecido en presencia de 20 mM de sulfato de sodio y expuesto a bajas concentraciones de los tres isómeros del cresol (Suffita *et al.*, 1989). Ramanand *et al.* (1991) demuestra que la degradación del compuesto 3-cresol, en presencia de 20mM de sulfato y empleando como inóculo una muestra de sedimentos anóxicos, se ve favorecida. El 85% del sustrato fue consumido después de 6 días bajo estas condiciones, con una fase de retardo de 2 días. Los mismos resultados se obtuvieron cuando la degradación se llevó a cabo utilizando un cultivo enriquecido.

1.3.4 Desnitrificación

El nitrógeno es un elemento importante para la vida y está presente tanto en suelos (9.4×10^{14} Kg), sedimentos (4×10^{17} Kg), agua (10×10^{14} Kg) y atmósfera (3.9×10^{18} Kg). En su forma orgánica comprende compuestos como proteínas, aminoácidos, péptidos; como nitrógeno inorgánico se incluye al ion amonio, amoniaco, nitrito, nitrato y óxidos de nitrógeno en forma gaseosa. El ciclo del nitrógeno juega un papel muy importante ya que animales, hongos y microorganismos tienen la capacidad de transformar el nitrógeno orgánico a inorgánico. Una parte muy importante es la desnitrificación que establece un balance en todo el ciclo.

Este proceso biológico es anaerobio, donde los intermediarios sirven como aceptores de electrones y se realiza en dos etapas siendo catalizado por sistemas enzimáticos (Sorensen y Jorgensen., 1993). Como se describe en la Tabla 1.6, la primera etapa consiste en la transformación de nitrato a nitrito y se denomina desasimilación reductiva. La segunda etapa comprende la reducción del nitrito a óxido nítrico (NO) así como, la reducción del óxido nitroso (N₂O) a nitrógeno elemental (Knowles, 1982; Hiscock *et al.*, 1991).

Tabla 1.6 Reacciones del proceso de desnitrificación.



El interés por la desnitrificación existe debido a varias razones:

1. Mayor mecanismo de pérdida de nitrógeno de los fertilizantes, lo cual genera que los fertilizantes no sean tan efectivos al momento de ser utilizados (Sorensen y Jorgensen, 1993).
2. Existe un gran potencial de aplicación en la remoción de nitrógeno inorgánico de materiales de desecho, ya que las altas cargas de este componente en el agua están asociadas a problemas de salud y produce una disminución de su calidad (Sorensen y Jorgensen, 1993; Hiscock *et al.*, 1991).
3. Proceso importante que contribuye a la concentración de N₂O en la atmósfera y que se ve envuelto en las reacciones de la estratosfera, dando como resultado una disminución en la concentración de ozono (Sorensen y Jorgensen, 1993).

Las bacterias desnitrificantes son bioquímicamente y taxonómicamente muy diferentes. La mayoría son heterótrofos y emplean una sola fuente de carbono tal como el metanol, etanol o el ácido acético. Existe también el grupo de bacterias autótrofas que utilizan hidrógeno, bióxido de carbono o reducen algunos compuestos azufrados, sin embargo, todas poseen las reductasas necesarias para reducir el nitrato a nitrógeno gaseoso, aunque algunas bacterias sólo logran obtener como producto final al óxido nitroso (Hiscock *et al.*, 1991; Knowles, 1982).

Dentro de los factores que controlan la desnitrificación se pueden resaltar como importantes la presencia de bajas concentraciones del ión nitrato, para que la actividad de las reductasas encargadas de la transformación de los intermediarios no se vea reprimida (Knowles, 1982). El pH óptimo para el proceso de desnitrificación está en el rango de 7-8. Algunas sustancias inhibitorias son la azida, algunos compuestos sulfurados (0.3 mM de S²⁻) y el oxígeno (0.2 mg/L) (Hiscock *et al.*, 1991). Se nombran a *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* como los grupos quizás más representativos de las bacterias desnitrificantes presentes en suelos y sedimentos acuáticos (Knowles, 1982).

Bajo condiciones de desnitrificación se ha demostrado la posibilidad de degradar compuestos aromáticos, como fenol, xilenos y benceno (Borden, 1994; Reinhard, 1994). Las bacterias desnitrificantes degradadoras de compuestos aromáticos se encuentran representadas en su mayoría por los géneros *Thauera* y *Azoarcus*. Reportes indican que uno de los primeros cultivos puros desnitrificantes capaz de utilizar para su crecimiento al fenol como única fuente de carbono fue la bacteria *Thauera aromatica*, nombrada anteriormente como *Desulfobacterium phenolicum* (Schie y Young, 1998). Recientemente, fueron aisladas de cultivos enriquecidos provenientes de sedimentos anaerobios obtenidos de diferentes regiones geográficas, tres nuevas cepas del género *Azoarcus* capaces de degradar el fenol. Los resultados muestran que son cepas dependientes de la presencia de dióxido de carbono disuelto en el medio y producen el 75% del nitrógeno teórico esperado. Sin embargo, no se obtuvieron resultados positivos con lo que respecta a la degradación de compuestos como el tolueno, benceno 2-cresol y 3-cresol, por parte de ninguna de las cepas (Schie y Young, 1998). La habilidad de emplear el 4-cresol como única fuente de carbono y energía por parte de bacterias provenientes de un cultivo enriquecido desnitrificante se mostró en el estudio de Haner *et al.* (1995), donde a los 21 días y a una temperatura de 20 °C, se dió una

completa conversión de este compuesto a nitrógeno, en contraste con sustratos como el benceno, metilbenzoato, etiltolueno, aminotolueno y 2-xileno, en donde no se observó un consumo del sustrato ni del nitrato presente. Pocos datos complementan la información de la alta persistencia de los compuestos alquilfenólicos bajo estas condiciones de óxido-reducción. Sin embargo, se ha observado que al igual que en la sulfato-reducción, la fase de retardo para compuestos como el 2-cresol es mucho más larga que la del 3- y 4-cresol. También hay reportes que hacen mención sobre la degradación del 2-cresol por parte de un cultivo mixto aclimatado a tolueno, en cometabolismo con tolueno (Flyvbjerg *et al.*, 1993).

Pocos datos se tienen sobre la capacidad de que los compuestos oxigenados sean degradados bajo condiciones de desnitrificación. La experiencia con suelos indica que la presencia de nitrato no promueve la degradación de MTBE ni ETBE (Yeh y Novak, 1994).

1.3.4 Fe (III) y Mn (IV)

Dentro de los compuestos más abundantes en la corteza terrestre se encuentran los metales, siendo el manganeso y el hierro de los que se encuentran en una proporción mayoritaria. El hierro es el cuarto elemento más abundante y su concentración estimada es de 5%, encontrándose presente en rocas, suelo y sedimentos (Lutz, 1995). Otra cifra menciona que el hierro se encuentra a concentraciones por arriba de 51 g/Kg y el manganeso en concentraciones de 0.9 g/Kg, distribuidos en tierra, estuarios y ambientes marinos (Langenhoff, 1997). Ambos se encuentran en la naturaleza con diferentes estados de oxidación. El hierro es común encontrarlo como 0,+2,+3, y el manganeso puede existir en su forma 0,+2,+3,+4,+6,+7. La presencia y acumulación de ambos metales en la naturaleza puede darse en forma de carbonatos, óxidos, silicatos etc, los cuales son compuestos insolubles (Tabla 1.7). De igual manera se pueden encontrar formando complejos con compuestos orgánicos tales como aminoácidos y sustancias húmicas o inorgánicos como SO_4^{2-} , Cl^- y HCO_3^- (Lutz, 1995).

Ambos metales son muy importantes en los sistemas biológicos, principalmente por ser elementos esenciales para microorganismos, plantas y animales. Activan a un gran número de enzimas y se ha observado que juegan un papel muy importante, principalmente en las reacciones

óxido-reducción acopladas al ciclo del carbón ya que tienen un alto potencial redox y se consideran excelentes aceptores de electrones.

Otra ventaja en el empleo de estos metales es que no hay pérdida de ellos en los diferentes ambientes en los que están presentes, de aquí la importancia de su ciclo natural que involucra una serie de reacciones de oxidación y reducción tanto químicas como biológicas. Como se puede observar en la Figura 1.5, en el ciclo de estos metales las formas reducidas Mn (II) y Fe (II) son oxidadas en ambientes aerobios y varios óxidos son formados. Estos óxidos regresan a los sedimentos por precipitación y se reducen en condiciones anaerobias obteniendo los estados de oxidación Mn (IV) y Fe (III).

Tabla 1.7 Formas de hierro y manganeso presentes en la naturaleza.

| FIERRO | | MANGANESO | | COMPLEJOS | |
|----------------------------------|-----------------------|----------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|---------------------|
| Oxidos e hidróxidos ¹ | | Oxidos e hidróxidos ² | | Fe-Mn-silicatos ² | |
| | | Birnesita | $Mn_6O_{14} \cdot 5H_2O$ | | |
| Goetita | $Fe_2O_3 \cdot H_2O$ | Buserita | óxido Na-Mn | | |
| Limonita | $Fe_2O_3 \cdot nH_2O$ | Hausmanita | Mn_3O_4 | Jacobsita | $MnFeO_4$ |
| | FeOOH | Holandita | $(Ba, K)_{12}Mn_8O_{16} \cdot xH_2O$ | Piromanganita | $(Mn, Fe)SiO_3$ |
| Hematita | Fe_2O_3 | Manganita | MnOOH | Rodonita | (Mn, Fe, |
| Magnetita | Fe_3O_4 | Manganosita | $(Ba, K, Mn^{+2}, Co)_2Mn_5O_{10}$ | | Ca)SiO ₃ |
| Ilmenita | $FeO \cdot TiO_2$ | Pirolusita | MnO_2 | | |
| | | Pirocroita | $Mn(OH)_2$ | | |
| Carbonatos | | Carbonatos | | Sulfuros | |
| Siderita | $FeCO_3$ | Rodocrosita | $MnCO_3$ | Albandita | MnS |

¹ Lutz, 1995

² Langenhoff, 1997

En sistemas con ausencia de oxígeno, muchas bacterias han demostrado ser capaces de reducir el Fe (III) a Fe (II) acoplado a la oxidación de una fuente de carbono. Entre las especies anaerobias estrictas presentes se encuentran *Geobacter metallireducens*, *G. sulfurreducens* y algunas BSR como *Desulfuromonas acetoxidans* y *Desulfovibrio desulfuricans*. Algunas de las bacterias son facultativas como las cepas de *Shewanella putrefaciens* y *Pseudomonas sp.* (Lutz, 1995). Estas bacterias son capaces de emplear diferentes tipos de sustratos donadores de electrones tal como acetato, lactato, etanol, butirato, propionato e hidrógeno (Lutz, 1995).

Algunas bacterias autótrofas como *T. thiooxidans*, *T. ferroxidans* y *Sulfolobus* son capaces de reducir el Fe (III) empleando al azufre como donador de electrones y como intermediario se obtiene sulfito (Lutz, 1995).

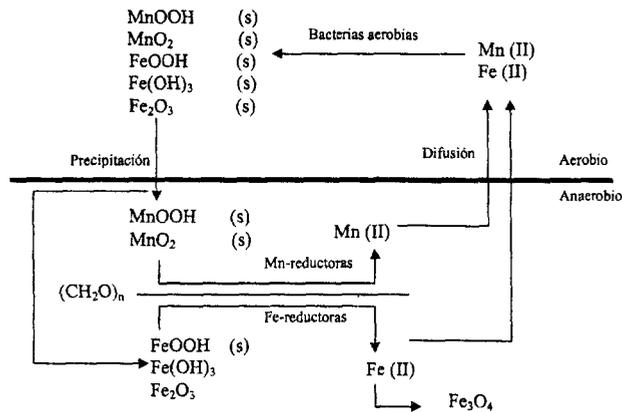


Fig. 1.5 Representación del ciclo natural del manganeso y el hierro (Langenhoff, 1997; Neilson y Myers, 1992)

Entre las bacterias que reducen el Mn (IV) como una alternativa de respiración, se mencionan a *Bacillus cereus*, *B. filaris*, *Anthrobacter*, bacterias gram positivo, y las bacterias gram negativo *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas sp.*. Así mismo, la bacteria anaerobia estricta *Geobacter metallireducens* la cual, a pesar de que tiene la capacidad de reducir tanto fierro como

manganeso, se ha demostrado que el sistema de enzimas involucradas no es el mismo (Langenhoff, 1997; Nealson y Myers, 1992; Lutz, 1995). Esta bacteria es la única que se ha logrado aislar y que es capaz de oxidar completamente tolueno, fenol, algunos aldehídos aromáticos, 4-cresol y alcoholes (Heider y Fuchs, 1997).

Dentro de la reducción microbiana del hierro y el manganeso, la forma mineral en que se encuentren estos metales es un factor importante a considerar ya que interviene en la reactividad. El empleo de óxidos amorfos de Fe (III) y Mn (IV) provoca que se utilicen rápidamente como aceptores de electrones por las bacterias, sobretodo si se compara con las formas más cristalinas de estos metales. De la misma manera, se debe tener en cuenta la habilidad que las bacterias reductoras presentan para solubilizar los óxidos, la capacidad de atacar y transferir los electrones y la habilidad de transportar el estado amorfo (sólido) dentro de la célula (Nealson y Myers, 1992).

En realidad, la biodegradación de compuestos recalcitrantes en este tipo de sistemas no ha sido estudiado extensamente, sobretodo si se compara con la gran información que existe para metanogénesis, sulfato-reducción y desnitrificación. Kazumi *et al.* (1995b) reportó la degradación de compuestos como el 2-,3- y 4-clorofenol acoplada a la reducción de Fe (III). En este estudio se obtuvo de un 89 al 138% de Fe (II) con respecto a la producción teórica, en periodos no mayores a 100 días. (Kazumi *et al.*, 1995b). La posibilidad de que las bacterias reductoras del hierro utilicen al fenol y 2-, 3- 4-cresol como única fuente de carbono y energía, se demostró en el estudio realizado por Kazumi *et al.*, (1995a) donde se utilizaron sedimentos enriquecidos del río Hudson como inóculo. 1 mM de fenol fue degradado en un periodo de incubación menor a 50 días obteniéndose 89% de Fe(II), con respecto a la producción teórica esperada. Para 0.2 mM de 3- y 4-cresol, se observó un decremento de la concentración a los 50 y 30 días, respectivamente. El 2-cresol resultó ser más persistente, sin embargo, se obtuvo su biodegradación a los 150 días de incubación. Ninguno de los compuestos etilfenólicos se logró degradar durante los 300 días en que fueron sometidos a estudio, bajo las mismas condiciones que los otros compuestos (Kazumi *et al.*, 1995a). La cepa de *Geobacter metallireducens* (GS-15) es de los pocos microorganismos que se sabe tienen la capacidad de acoplar la oxidación de hidrocarburos aromáticos a la reducción de Fe (III). El tolueno, 4-cresol y el fenol son degradados por este microorganismo (Lovley y Lonergan, 1990).

La oxidación de los compuestos alquilfenólicos bajo la condición de reducción de Mn (IV) no está bien documentada. Langenhoff (1997) mostró que los compuestos aromáticos tolueno y antraceno son degradados en columnas anaerobias en presencia de nitrato y Mn (IV) como aceptores de electrones, utilizando diferentes sedimentos entre ellos el del río Rhin. Sin embargo, no hubo suficientes evidencias para demostrar la degradación del 4-cresol bajo estas condiciones, a pesar de que este isómero cresílico ha demostrado ser el compuesto menos persistente a ser degradado bajo condiciones anaerobias. De igual manera el benceno, resultó ser recalcitrante bajo condiciones de sulfato-, nitrato-, Fe (III)- y Mn (IV)- reducción a 20 °C, durante un periodo de incubación de 375 a 525 días.

1.3.6 Sustancias húmicas

Las sustancias húmicas son compuestos orgánicos de alto peso molecular que se encuentran de manera natural en ambientes terrestres y acuáticos. Se considera que están relacionadas con los procesos microbianos, principalmente en ambientes anaerobios. Reportes indican que algunos microorganismos son capaces de utilizar estas sustancias húmicas como aceptores de electrones en la oxidación de materia orgánica e hidrógeno es decir, son sustancias capaces de soportar el crecimiento microbiano (Lovley *et al.*, 1996). Se ha observado que también desempeñan una función como mediadores de electrones en la reducción de metales como el hierro. Por medio de este mecanismo se ve aumentada la capacidad de algunas bacterias reductoras de Fe (III), ya que los óxidos insolubles de este metal se convierten en compuestos más accesibles. Los compuestos modelo de las sustancias húmicas son antraquinona sulfonato (AQS) y antraquinona disulfonato (AQDS), ambas sustancias son quinonas extracelulares que pueden servir como aceptores de electrones como se tiene reportado para los microorganismos *Geobacter metallireducens* y *Shewanella alga* (Coates *et al.*, 1998). Bacterias como *Propionibacterium freudenreichii*, *Lactococcus lactis* y *Enterococcus cecorum*, son capaces de reducir las sustancias húmicas en presencia de hierro amorfo y de diferentes fuentes de carbono como donadores de electrones (Benz *et al.*, 1998).

El proceso de reducción de las sustancias húmicas es muy importante ya que representa un mecanismo de oxidación de la materia orgánica, así como de ser empleado para estimular la degradación de algunos compuestos xenobióticos (Figura 1.6). Algunos reportes dan evidencia que existe una estimulación en la reducción de compuestos nitroaromáticos al transferir los electrones del H₂S en presencia de AQDS (Keck *et al.*, 1997). Resultados similares se observaron con AQDS y otros compuestos húmicos modelo en la descloración reductiva de compuestos organoclorados como el tetracloroetano (Curtis y Reinhard, 1994). La mineralización del dicloroetano y el compuesto cloruro de vinilo se demostró en el estudio de Bradley *et al.* (1998) con la presencia de sustancias húmicas como aceptor de electrones. Un estudio mostró que la degradación de benceno, bajo condiciones de reducción del hierro (III) en presencia de compuestos húmicos, se ve estimulada en comparación del uso de compuestos quelantes sintéticos sin que estas sustancias tengan la misma capacidad quelante que las otras (Lovley *et al.*, 1996).

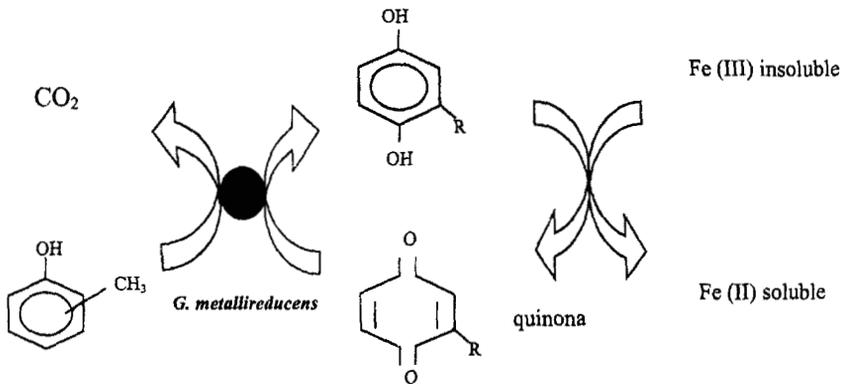


Fig. 1.6 Esquema del mecanismo de óxido-reducción en presencia de quinonas y óxido de Fe (III) como aceptor de electrones (e.g. la degradación de los compuestos alquilfenólicos).

Capítulo 2



OBJETIVOS E HIPOTESIS

2.1 Objetivo general

Estudiar la biodegradabilidad en lote de los compuestos oxigenados y alquilfenólicos bajo diferentes condiciones anaerobias.

2.1.1 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto tóxico de los compuestos MTBE, ETBE, TAME y TBA, hacia las bacterias metanogénicas acetoclásticas.
- Estudiar la degradabilidad de los compuestos MTBE, ETBE, TAME y TBA bajo condiciones de metanogénesis. De igual manera, evaluar el empleo de aceptores de electrones alternativos como el Mn (IV), Fe (III) y el compuesto AQDS.
- Estudiar la degradación de los compuestos alquilfenólicos como; 2-cresol, 2,6-dimetilfenol y 2-etilfenol bajo condiciones de metanogénesis, así como evaluar el efecto de la presencia de sulfato, nitrato, Mn (IV), Fe (III) y el compuesto AQDS como principales aceptores de electrones en la oxidación de estos compuestos.

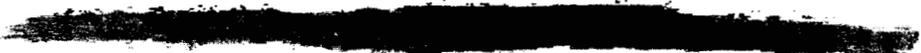
2.2 Hipótesis

En principio, cualquier compuesto puede ser degradado en presencia de aceptores de electrones siempre y cuando estos compuestos puedan proporcionar la energía necesaria para que se lleve a cabo la reacción de óxido-reducción (redox). El cálculo de cambio de energía libre de Gibbs (ΔG°) de la oxidación del fenol y los isómeros del cresol, acoplados a la reducción de diferentes aceptores de electrones bajo condiciones estándar (25°C, pH 7, 1 atm, 1M) se muestra en la Tabla 2.1. Podemos observar que para estos compuestos las reacciones de oxidación-reducción son exergónicas, por lo tanto son energéticamente favorables. Con respecto a los compuestos oxigenados no se tienen disponibles los datos de energía libre de Gibbs, sin embargo, se espera una posible degradación de estos compuestos con el uso de aceptores de electrones con un alto potencial redox como el Fe (III) y Mn (IV). Adicionalmente al aspecto energético, se puede favorecer la degradación de estos compuestos recalcitrantes por medio del empleo de un consorcio adecuado.

Tabla 2.1 Energía libre de Gibbs (ΔG°) en la oxidación del 2-,3-,4-cresol y fenol en diferentes condiciones de óxido-reducción (Thauer *et al.*, 1977).

| | ΔG° (kcal/mol) | | | |
|-------------------|-----------------------------|----------|----------|---------|
| | 2-cresol | 3-cresol | 4-cresol | fenol |
| Fe (III) | -696.22 | -695.39 | -697.41 | -397.62 |
| Desnitrificación | -739.18 | -737.95 | -739.95 | -851.44 |
| Sulfato-reducción | -80.63 | -79.80 | -81.82 | -65.40 |
| Metanogénesis | -46.79 | -45.96 | -47.98 | -39.95 |

Capítulo 3



MATERIALES Y METODOS

227624

3.1 Metodologías

3.1.1 Inóculo

En los experimentos se utilizaron tres distintos inóculos: lodo granular aclimatado a compuestos derivados de la industria del petróleo, proporcionado por la compañía Shell Nederland Chemie (Moerdijk, Holanda), con un contenido de sólidos suspendidos volátiles (SSV) de 6.11% y una actividad metanogénica de 0.55 g de demanda química de oxígeno (DQO)-CH₄/g SSV-d; lodo granular proveniente de la compañía Nedalco (Holanda) que trata aguas residuales de destilería con un contenido de SSV de 8.59% y una actividad de 0.96 g DQO-CH₄/g SSV-d; sedimento anaerobio obtenido del río Rhin (Wageningen, Holanda), presentando un 4.47% de SSV

3.1.2 Medio basal

El medio basal utilizado para los ensayos de biodegradación contiene lo siguiente (mg/L): NaHCO₃ (5000), NH₄Cl (280), CaCl₂ • 2H₂O (10), K₂HPO₄ (250), MgSO₄ (100), extracto de levadura (100) y 1 mL de solución de micronutrientes que contiene (mg/L): FeCl₂ • 4H₂O (2000), H₃BO₃ (50), ZnCl₂ (50), CuCl₂ • 2 H₂O (38), MnCl₂ • 4H₂O (500), (NH₄)₆Mo₇O₂₄ • 4H₂O (50), AlCl₃ • 6H₂O (90), CoCl₂ • 6H₂O (2000), NiCl₂ • 6 H₂O (142), Na₂SeO • 5H₂O (164), EDTA (1000), resazurina (200), HCl 36% (1 mL).

3.1.3 Toxicidad anaerobia

El ensayo de toxicidad anaerobia se realizó en botellas serológicas de 120 mL. A cada una de las botellas serológicas se les adicionó 2 g SSV/L de lodo granular Shell como inóculo, 25 mL de medio basal y acetato (2.5 g DQO/L) proveniente de una solución concentrada y pH= 7. Las botellas serológicas se sellaron con tapones de caucho de 12 mm de espesor, posteriormente se hizo el cambio de atmósfera con una mezcla de gases que contiene 30% CO₂ y 70 % N₂ durante 5 minutos y se incubaron a 30 °C durante 24 horas.

Después de este periodo, el compuesto tóxico a probar se adicionó a partir de una solución concentrada y neutra. Después de 72 horas de exposición al tóxico, la concentración de acetato se restableció a 1 g DQO/L, realizándose nuevamente el cambio de atmósfera con la mezcla de gases durante 5 minutos y se incubaron a 30 °C durante una hora. Después de este periodo se realiza la determinación de metano en el espacio de cabeza cada hora, durante un periodo de 6 a 8 horas de incubación. La actividad metanogénica acetoclástica es calculada a partir de la pendiente que se obtiene al graficar producción de metano contra el tiempo. Para determinar el grado de inhibición, se montó un control donde se siguió la misma metodología a excepción de la sustancia tóxica. Las sustancias húmicas evaluadas son antraquinona sulfonato de sodio (AQS) a concentraciones de 164 y 465 mg/L y antraquinona disulfonato de sodio (AQDS) a concentraciones de 206 mg/L y 618.46 mg/L. También se evaluó la toxicidad de los compuestos oxigenados a una concentración de 1 g/L. Esta prueba fue realizada por triplicado.

3.1.4 Biodegradabilidad anaerobia

El ensayo de biodegradabilidad anaerobia en lote se realizó en botellas serológicas con capacidad de 120 mL por triplicado. Como inóculo se transfirieron 2 g SSV/L de lodo granular Nedalco o 10%-volumen de sedimento anaerobio a las botellas que contienen medio basal; 25 mL para los compuestos MTBE, ETBE, TAME y 50 mL para los compuestos TBA, 2-cresol, 2,6-dimetilfenol y 2-etilfenol. Las botellas serológicas se sellaron con tapones de caucho con un espesor de 12 mm. Posteriormente se hizo el cambio de atmósfera durante 5 minutos con una mezcla de gases que contiene 30% CO₂ y 70% N₂, incubándose a 30 °C durante una noche para que se lleve acabo el consumo del oxígeno remanente en cada una de las botellas. Al día siguiente, se adicionó la cantidad necesaria de la solución concentrada de cada uno de los compuestos, los cuales se adicionaron a concentraciones subtóxicas y como única fuente de carbón y energía. Para los compuestos oxigenados se empleó 1 g/L y para los compuestos alquilfenólicos la concentración fue de 150 mg/L. Esta prueba se llevó a cabo con la presencia de diferentes aceptores de electrones; para las condiciones de desnitrificación y sulfato-reducción se adicionó KNO₃ y Na₂SO₄ a una concentración de 2 g/L. El Mn (IV) y el Fe (III) fueron suministrados en su forma amorfa (hidróxido-óxido) en concentraciones de 68 g/L y 80 g/L, respectivamente, para los

compuestos oxigenados. Para los compuestos alquilfenólicos se adicionó 4.44 g/L de Mn (IV) y 8.88 g/L de Fe (III). El compuesto AQDS se utilizó a una concentración catalítica de 206 mg/L.

Posteriormente las botellas serológicas se incubaron a 30 °C en una agitadora que los mantiene a 50 rpm. El ensayo se realizó por triplicado con la presencia de controles que no contienen los compuestos a estudiar. Con el objetivo de descartar cualquier reacción abiótica o fenómenos de absorción en cada uno de los sistemas, se montaron controles estériles por triplicado, los cuales fueron incubados durante 2 días y posteriormente esterilizados durante 40 minutos a 15 psi. Los experimentos fueron monitoreados sistemáticamente a través de la determinación de metano, sulfato o nitrato, así como la concentración de cada uno de los compuestos sometidos al ensayo por un periodo promedio de 100 días.

3.1.5 Preparación de los óxidos de Mn (IV) y Fe (III)

La forma amorfa del Mn (IV) se obtuvo mezclando volúmenes iguales de soluciones 0.4 M de KMnO_4 y MnCl_2 , la solución final se llevó a pH= 10 añadiendo NaOH (Lovley y Phillips, 1988). El Fe (III) amorfo se elaboró neutralizando una solución 0.4 M de FeCl_3 con NaOH. Ambos metales se lavaron 4 veces con agua desmineralizada (Langenhoff, 1997).

3.2 Métodos analíticos

3.2.1 Determinación de los compuestos oxigenados

El análisis de los compuestos MTBE, ETBE y TAME se realizó por medio de cromatografía de gases, tomando muestra del espacio de cabeza de cada botella con una jeringa Pressure-lock (volumen de inyección fue de 100 μ L). El equipo empleado fue Interscience GC8000, con las siguientes características:

| | | |
|----------------|---|---|
| Columna | : | 624 (30m X 0.53mm X 3 μ m) |
| Splitflow | : | 103 mL/min |
| Gas acarreador | : | Helio 50 mL/min |
| Temperatura | : | Columna 40 °C Detector 240 °C Inyector 200 °C |
| Detector | : | FID (Flame Ionization Detector) |

Los estándares fueron preparados en botellas de 120 mL con 25 mL de medio basal adicionando 1 g/L de cada uno de los compuestos. Los tiempos de retención para MTBE, ETBE y TAME fueron de 2.5, 3.02 y 4.98 min, respectivamente.

3.2.2 Determinación de los compuestos alquilfenólicos y TBA

El análisis de los compuestos 2-cresol, 2,6-dimetilfenol, 2-etilfenol y TBA se realizó en muestras líquidas por medio de cromatografía de gases en un equipo Hewlett Packard 5890, con las siguientes características:

- Columna : Vidrio (2m X 6mm X 2mm); 10% Fluorad 431 en Supelco-port malla 100-200 .
 Gas acarreador : Nitrógeno, saturado con ácido fórmico; 40 ml/min.
 Temperatura : Horno 130 °C (TBA 70 °C)
 Detector 280 °C
 Inyector 200 °C
 Detector : FID (Flame Ionization Detector).
 Muestra : Centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos.
 El volúmen de inyección fue de 1 µL.

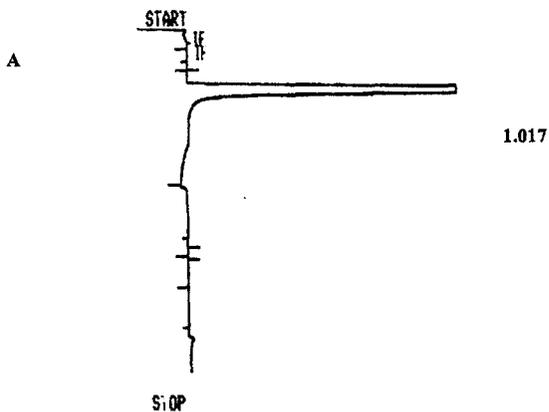


Fig. 3.1 Cromatograma del análisis de TBA.

Se emplearon estándares de 1 g/L para cada uno de los compuestos. Los tiempos de retención fueron de 1.01 para el TBA (A) y para el 2-cresol (B), 2,6-dimetilfenol (C) y 2-etilfenol (D) fueron 9.85, 7.35 y 14.32 min, respectivamente.

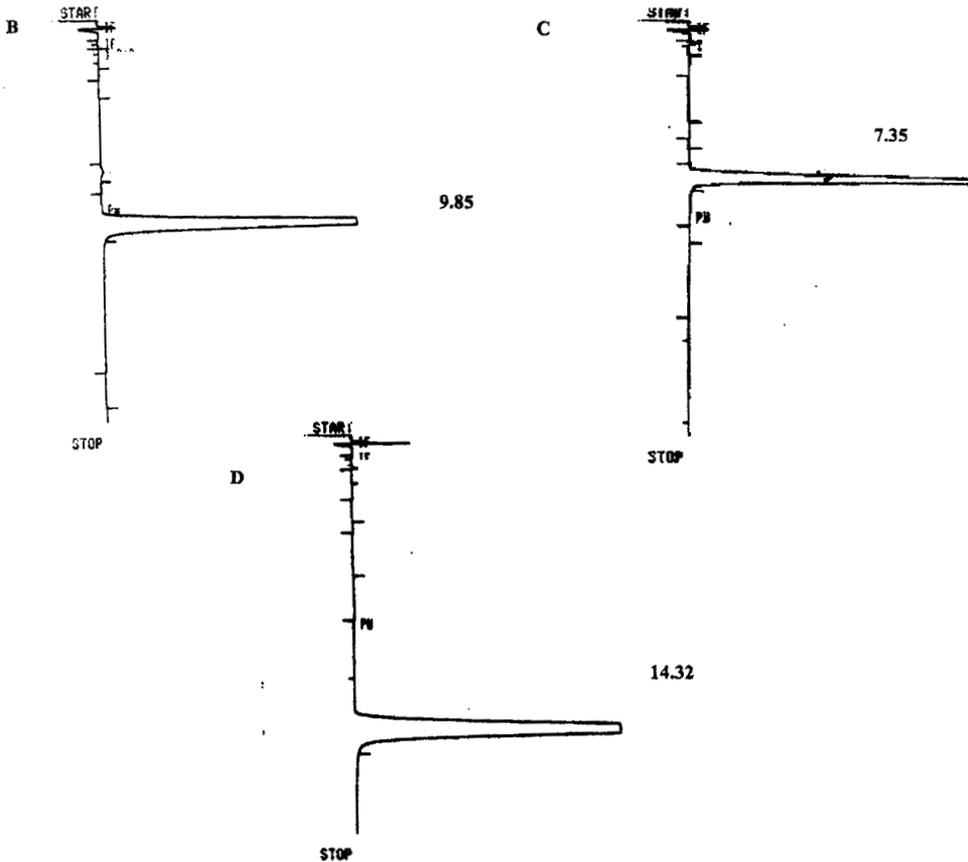


Fig. 3.2 Cromatogramas del análisis de los compuestos alquilfenólicos.

3.2.3 Determinación de SO_4^{2-} y NO_3^-

La determinación de la concentración de sulfato (SO_4^{2-}) y nitrato (NO_3^-) en muestras líquidas se realizó por medio de cromatografía de iones en un equipo con las siguientes características:

| | | |
|-------------|---|---|
| Columna | : | Vydac-anion exchange 5 μm (302IC405) 250 X 4.6 mmL X ID. |
| Fase móvil | : | 0.009 M ftalato ácido de potasio |
| Flujo | : | 1.2 mL/min. |
| Temperatura | : | 20 °C. |
| Detector | : | Conductividad Mod.Waters 431. |
| Muestra | : | Centrifugar a 1000 rpm. durante 5 minutos. 20 μL . |
| Estándares | : | Merck SO_4^{2-} 1000 mg/L. Merck NO_3^- 1000 mg/L. |

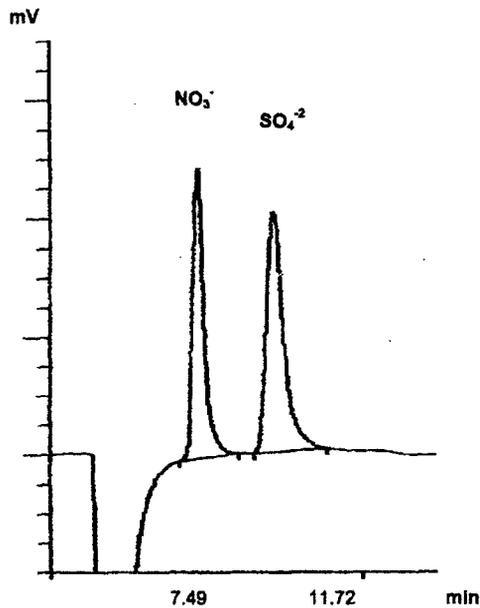


Fig. 3.3 Cromatograma de la determinación de los iones nitrato y sulfato por HPLC.

3.2.4 Determinación de metano

La determinación de metano se realizó en un cromatógrafo de gases Chrompack Packard Mod. 438S, con las siguientes características:

Columna : Acero (2m X 2mm); Porapak Q, 80-100 mesh.
 Gas acarreador : Nitrógeno; 20 mL/min.
 Temperatura : Horno 60 °C
 : Inyector 200 °C
 : Detector 200 °C
 Detector : FID (Flame ionization detector)
 Muestra : 100 µL.
 Estándar : Hoek Loss 50.11% de metano.

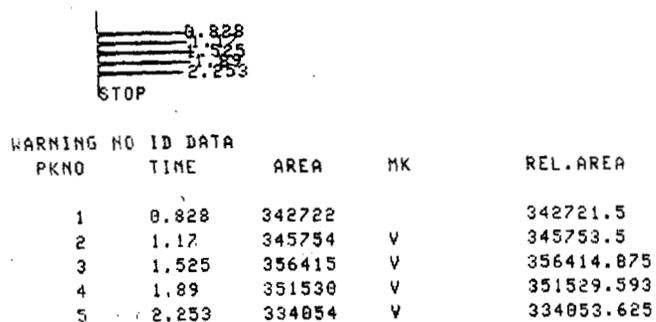


Fig. 3.4 Cromatograma de la determinación de metano.

3.2.5 Determinación de sólidos suspendidos volátiles (SSV)

La determinación de SSV se realizó de acuerdo a APHA (1985). Una muestra homogenizada se filtra a través de una membrana de fibra de vidrio, ya pesado, el residuo retenido en el filtro es secado a 103-105 °C hasta peso constante. El aumento en el peso del filtro representa los sólidos suspendidos totales (SST). Se calcinan los residuos obtenidos de los sólidos suspendidos totales hasta obtener peso constante a 550 °C en la mufla (por un periodo de 15 a 30 minutos) y se obtienen los sólidos suspendidos fijos (SSF). La diferencia entre los sólidos suspendidos totales y los suspendidos fijos son los sólidos suspendidos volátiles. Los cálculos se realizan empleando las fórmulas que aparecen a continuación:

$$\text{gSST}/100 \text{ g} = (A-B) * 100/ \text{P.M.}$$

$$\text{gSSF}/100 \text{ g} = (C-B) * 100/ \text{P.M.}$$

$$\text{SST} - \text{SSF} = \text{SSV}$$

Donde:

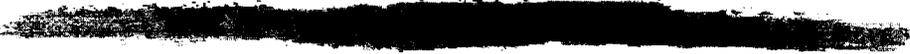
A= Peso del filtro + material seco (g)

B= Peso del filtro seco (g)

C= Peso del filtro + material calcinado (g)

P.M.= Peso de la muestra (g)

Capítulo 4



RESULTADOS Y DISCUSION

227624

4.1 COMPUESTOS OXIGENADOS

4.1.1 Prueba de toxicidad anaerobia

Tres de los compuestos más importantes en la producción de gasolinas oxigenadas (MTBE, ETBE y TAME) fueron sometidos a una prueba de biodegradabilidad anaerobia en presencia de diferentes aceptores de electrones. En las mismas condiciones se probó TBA, seleccionado por ser un probable intermediario del mecanismo de degradación anaerobia de los compuestos antes mencionados. Como una prueba preliminar fue importante determinar el grado de toxicidad anaerobia que generan estos compuestos en los sistemas anaerobios. La concentración probada fue de 1 g/L y los resultados de esta prueba señalan que la actividad metanogénica acetoclástica no se ve reducida por la presencia de ninguno de los compuestos oxigenados, lo cual se puede apreciar en la Figura 4.1.

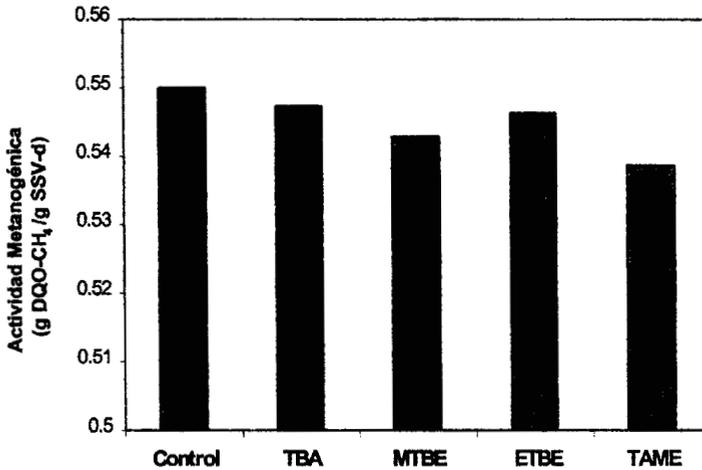


Fig. 4.1 Comparación de las actividades metanogénicas acetoclásticas obtenidas en la prueba de toxicidad de los compuestos oxigenados (1g/L).

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Mormille *et al.* (1996) al realizar la prueba de toxicidad para diferentes hidrocarburos presentes en las gasolinas, como el MTBE (52.8 mg/L), utilizando glucosa como sustrato en un sistema creado con sedimento y agua extraída de un acuífero.

4.1.2 Prueba de biodegradabilidad

La prueba de biodegradabilidad se llevó a cabo empleando dos diferentes inóculos, un lodo granular (Nedalco) y el sedimento anaerobio extraído del río Rhin. Los resultados de esta prueba se muestran en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1 Resultados de la prueba de biodegradabilidad anaerobia de los compuestos oxigenados (1g/L).

| Condiciones anaerobias | Inóculo | MTBE | ETBE | TAME | Incubación (d) | TBA | Incubación (d) |
|------------------------|---------|------|------|------|----------------|-----|----------------|
| Metanogénesis | LG | - | - | - | 110 | - | 110 |
| | SA | - | - | - | 96 | - | 96 |
| Fe (III) | LG | - | - | - | 80 | - | 116 |
| | SA | - | - | - | - | - | 96 |
| Mn (IV) | LS | N.D. | N.D. | N.D. | - | - | 116 |
| | SA | - | - | - | 80 | - | 96 |
| Mn (IV) /AQDS | SA | - | - | - | 80 | - | 96 |
| AQDS | SA | N.D. | N.D. | N.D. | 80 | - | 96 |

LG = Lodo granular Nedalco
 SA = Sedimento anaerobio río Rhin.
 N.D. = No determinado.
 (-) No se observó degradación.

Después de un periodo de incubación de más de 80 días se observó que no hubo evidencia de degradación de estos compuestos bajo ninguna de las condiciones anaerobias empleadas, sugiriendo que la degradación anaerobia de estos compuestos no es un proceso común, por lo cual se consideran compuestos persistentes bajo las condiciones probadas.

Una posible explicación de la persistencia de estos compuestos a la degradación anaerobia puede estar relacionada con su estructura. El MTBE, ETBE y TAME son hidrocarburos con una molécula de oxígeno, denominados químicamente éteres. Su estructura química es ramificada con la presencia de un carbón terciario, el cual les proporciona una mayor estabilidad química, propiedad que los llevó a ser seleccionados como compuestos primordiales para mantener el índice de octano en la gasolinas. Una evidencia de la relación entre la estructura química y la persistencia a la mineralización anaerobia de este tipo de compuestos se observa cuando el análogo lineal del MTBE, el butil-metil éter, es completamente mineralizado a metano. Sin embargo, este proceso se llevó a cabo en 84 días de incubación, periodo que se tomó como referencia para determinar la duración de la prueba de biodegradabilidad (Sufliya y Mormille, 1993; Mormille *et al.*, 1996). Otros reportes coinciden en señalar que bajo condiciones de metanogénesis en sistemas donde se utilizan sedimento y agua extraída de lugares contaminados, la degradación de los compuestos oxigenados no se lleva a cabo en periodos de incubación mayores a los 249 días (Sufliya y Mormille, 1993).

En el caso de los alcoholes sucede lo mismo, el TBA es un alcohol ramificado y no biodegradable en condiciones anaerobias. Sin embargo, el metanol al ser un alcohol con una estructura simple, es completamente mineralizado bajo condiciones metanogénicas rápidamente así como, en presencia de diferentes aceptores de electrones (Sufliya y Mormille, 1993; Sorensen y Jorgensen, 1993; Mormille *et al.*, 1996).

Comparando el potencial de degradación anaerobia de compuestos como las cetonas, alcoholes y ésteres, los éteres son los compuestos más recalcitrantes, a pesar de que los compuestos oxigenados no mostraron ser tóxicos para las bacterias anaerobias (Sufliya y Mormille, 1993; Mormille *et al.*, 1996).

4.2 COMPUESTOS ALQUILFENOLICOS

4.2.1. Prueba de biodegradabilidad

Los resultados de biodegradabilidad anaerobia de los compuestos alquifenólicos se muestran en la Tabla 4.2. En el caso del 2-cresol, 2,6-dimetilfenol y 2-etilfenol se puede observar que las condiciones anaerobias tradicionales como la metanogénesis, sulfato-reducción y desnitrificación no favorecieron su mineralización, en un periodo de 100 días de incubación. El mismo efecto se observó bajo condiciones de reducción de Fe (III) y la presencia de AQDS. Se descarta un efecto tóxico de estos compuestos hacia las bacterias anaerobias, debido a que la concentración empleada de cada uno de los compuestos fue menor al CI_{50} descrito por Sierra y Lettinga (1991).

En los experimentos realizados bajo condiciones de Mn (IV)- reducción con y sin AQDS, se observó la mineralización de 2-cresol y 2-etilfenol. Para el 2-cresol y el 2-etilfenol, se obtuvo un 96% y un 92% de degradación, respectivamente, en un periodo menor a 15 días lo cual se puede observar en la Figura 4.2.

Tabla 4.2 Resultados de la prueba de biodegradabilidad anaerobia para los compuestos alquilfenólicos (150 mg/L).

| Condiciones anaerobias | Inóculo | 2-cresol | 2,6-dimetilfenol | 2-etilfenol | Incubación (d) |
|-------------------------------|---------|----------|------------------|-------------|----------------|
| Metanogénesis | LG | - | - | - | 100 |
| | SA | - | - | - | 23 |
| SO ₄ ⁻² | LG | - | - | - | 100 |
| NO ₃ ⁻ | LG | - | - | - | 100 |
| Fe (III) | SA | - | - | - | 20 |
| Mn (IV) | SA | + | + ^a | + | 23 |
| Mn (IV)/AQDS | SA | + | + ^a | + | 23 |
| AQDS | SA | - | - | - | 23 |

LG = Lodo granular Nedaico.

SA = Sedimento anaerobio río Rhin.

(-) No se observó degradación.

(+) Completamente degradable.

(a) Degradación abiótica.

Es apreciable que en la degradación de estos compuestos la mayor velocidad se presenta durante los primeros tres días de incubación. La velocidad de consumo durante este tiempo fue de 9.81 ± 1.57 mg/L-d y 8.33 ± 0.39 mg/L-d para el 2-cresol y 2-etilfenol, respectivamente. En el caso de la combinación de Mn (IV) con AQDS, la velocidad de consumo de los compuestos se ve reducida a 6.6 mg/L-d para el 2-cresol y 7.043 ± 0.3 mg/L-d en el caso del 2-etilfenol. Esta reducción en las velocidades de degradación indica que el compuesto AQDS inhibe de cierta manera la degradación de los compuestos alquilfenólicos en presencia de Mn (IV). El decremento en la concentración del 2,6-dimetilfenol se dio de igual manera tanto en las botellas de tratamiento como en los controles estériles, lo que nos indica que la biodegradación fue abiótica es decir, que el compuesto fue oxidado químicamente por el Mn (IV) presente en el sistema.

Con el objetivo de observar si era posible sostener la biodegradación de estos compuestos bajo las condiciones de reducción de Mn (IV), se realizó una segunda alimentación, representada por una flecha en la Figura 4.2. Se adicionó la misma concentración de cada uno de los compuestos y del óxido de Mn (IV), sin que se observara algún incremento significativo en la velocidad de degradación. Sin embargo, en los controles estériles, tanto para el 2-cresol y el 2-etilfenol, la velocidad de la reacción fue diez veces más rápida a la inicial. Esto probablemente se debió a un exceso de Mn (IV) insoluble como óxido, que al momento de la segunda alimentación no fue retirado del sistema, esto generó que la velocidad de oxidación química entre el manganeso y los compuestos fenólicos aumentara.

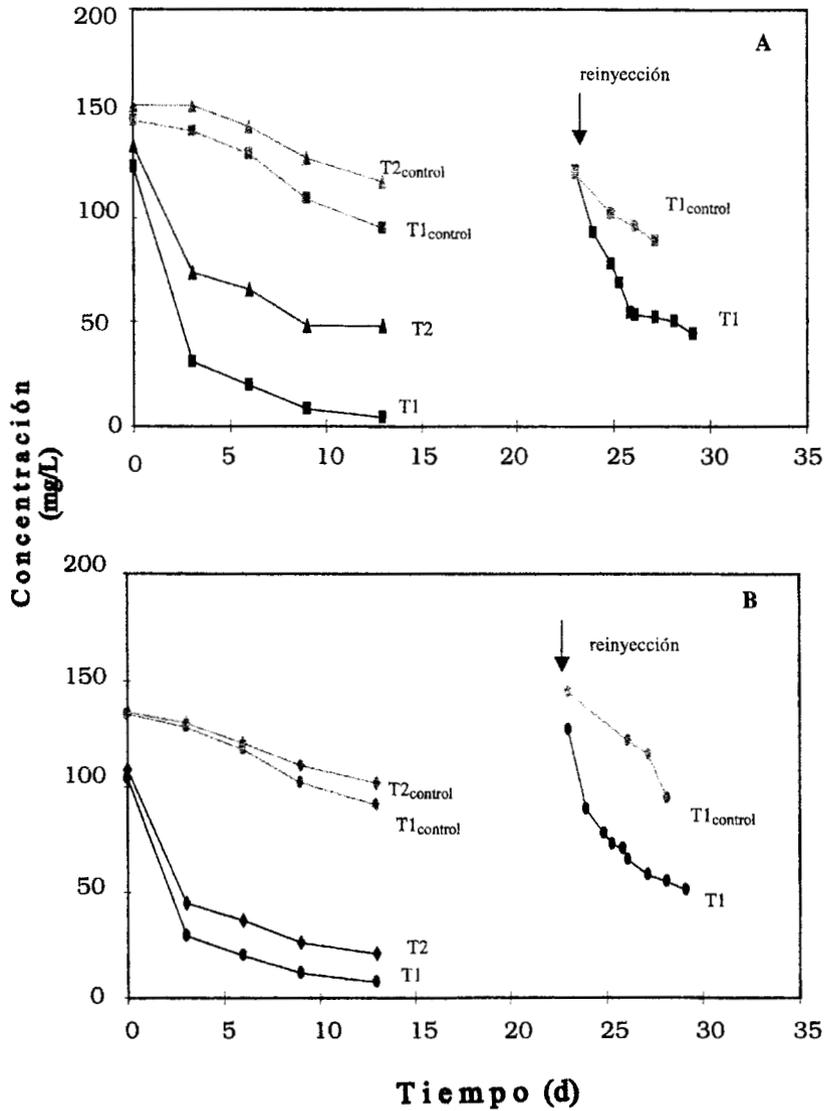


Fig. 4.2 Perfil de la degradación anaerobia del 2-cresol (A) y 2-etilfenol (B) con Mn (IV) (T1) y Mn (IV)/AQDS (T2) como aceptores de electrones.

Para descartar el hecho de una oxidación química del 2-cresol y 2-etilfenol en presencia del Mn (IV), se realizaron barridos en la región UV y que se muestran en la Figura 4.3. En esta figura se aprecia la pérdida de la aromaticidad en las botellas tratamiento a los 23 días de incubación tanto para el 2-cresol (A) y 2-etilfenol (B), confirmando que bajo las condiciones de Mn (IV)-reducción se llevó a cabo la completa mineralización de estos compuestos. No así en el caso de los controles estériles (C y D) donde se observa que los compuestos no fueron mineralizados.

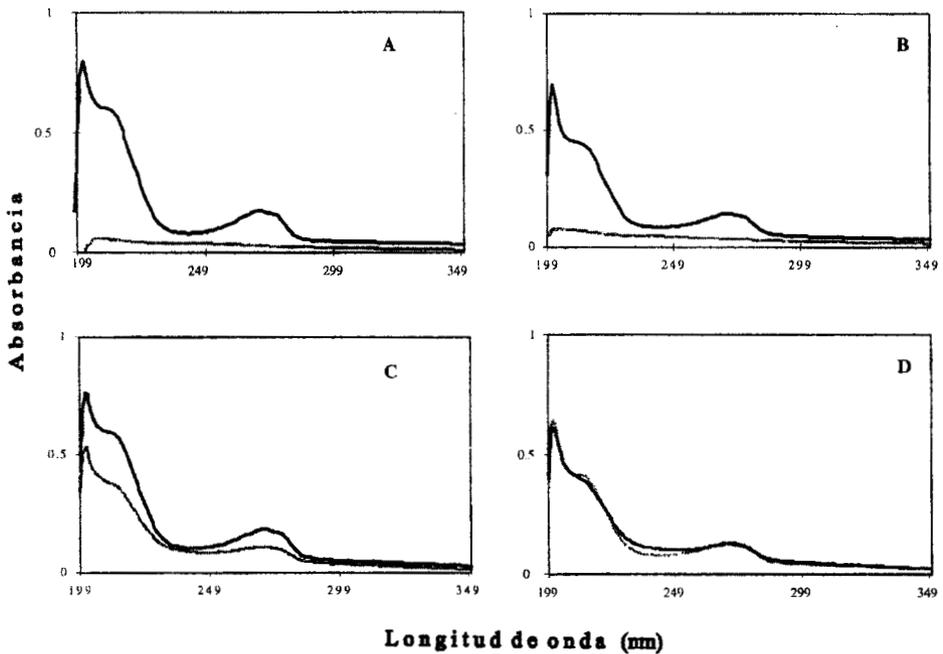


Fig. 4.3 Barridos UV de 2-cresol (A) y 2-etilfenol (B) en los tratamientos y los respectivos controles estériles (C y D). Absorbancia al inicio del experimento (—) y a los 23 días (---) de incubación. Las muestras fueron diluidas 20 veces con una solución amortiguadora de fosfato a pH= 7.

Los resultados obtenidos coinciden con diferentes reportes que mencionan la persistencia de este tipo de compuestos al ser usados como única fuente de carbono y energía bajo condiciones anaerobias tradicionales (Fedorak y Hudrey, 1984; Blum *et al.*, 1986; Bisailon *et al.*, 1991). En la degradación de los compuestos aromáticos la estabilidad química que les confiere el anillo bencénico, al igual que la posición y las características del (os) grupo (s) sustituido(s) son factores limitantes. Esto hace que la capacidad de ser degradados varíe e inclusive se ha observado que la ruta anaerobia de degradación de los cresoles resulta ser diferente dependiendo del isómero de que se trate (Heider y Fuchs, 1997). En los datos disponibles hasta ahora, se hace una distinción entre los mecanismos de degradación del 4-cresol, vía la oxidación del grupo metilo, y los del 2- y 3-cresol, degradación probablemente iniciada por una reacción de carboxilación (Heider y Fuchs, 1997). De cierta manera, esto se vincula con la diferencia que existe en la duración de las fases de retardo y los diferentes microorganismos capaces de degradar a cada uno de los isómeros. El fenol y 4-cresol, por lo general, presentan fases de retardo mucho menores a las que se presentan en la degradación del 2 y 3-cresol, que en muchos casos no son completamente mineralizados (Fedorak y Hudrey, 1984; Battersby y Wilson, 1989). También hay reportes que muestran que el 2-cresol es un compuesto que se degrada bajo condiciones de desnitrificación en presencia de un cosustrato como el tolueno (Heider y Fuchs, 1997). Bajo condiciones de reducción de Mn (IV), pocos reportes destacan la degradación de algún compuesto con la estructura química de los alquilfenoles, por lo que la comprobación de la mineralización del 2-cresol y 2-etilfenol bajo estas condiciones es muy importante.

No se comprobó que el compuesto AQDS fuera utilizado como único aceptor de electrones en la degradación de ninguno de los compuestos estudiados. Sin embargo, se tienen evidencias cualitativas de la formación de AHQDS, forma reducida del AQDS de color anaranjado, sugiriendo que el compuestos AQDS actuó como aceptor de electrones en la oxidación de materia orgánica presente en el inóculo.

La degradación de los compuestos alquilfenólicos 2-cresol y 2-etilfenol se vio inhibida por la presencia del compuesto AQDS como mediador de electrones entre la oxidación de estos compuestos y el aceptor de electrones Mn (IV), mecanismo contradictorio al reportado en diferentes trabajos, donde la presencia de este tipo de compuestos favorece la velocidad de degradación anaerobia de diferentes compuestos recalcitrantes como benceno y algunos compuestos policlorados, bajo condiciones de reducción de Fe (III). Esto podría explicarse con los resultados que se muestran en la Figura 4.4, donde se observa que la actividad metanogénica se ve inhibida, por la presencia de las sustancias húmicas, en diferente grado dependiendo de la concentración. De igual manera, puede existir un posible mecanismo de competencia entre aceptores de electrones.

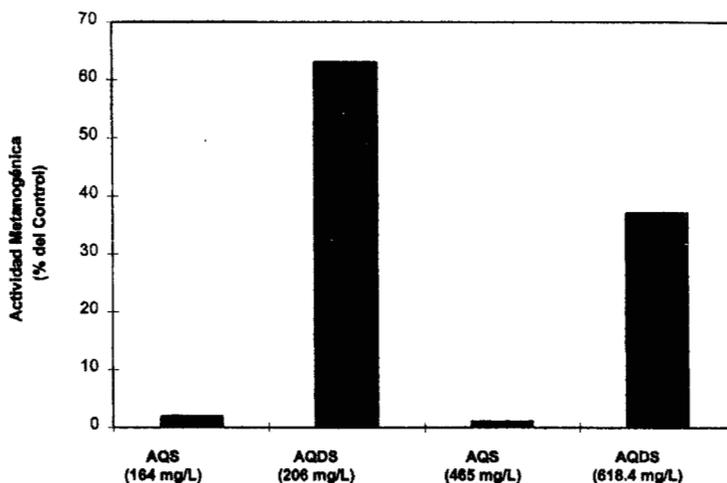
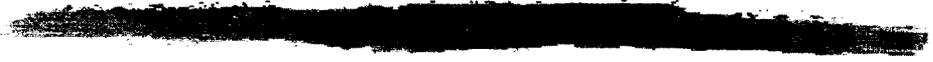


Fig. 4.4 Efecto inhibitorio de los compuestos AQS y AQDS sobre la actividad metanogénica acetoclástica.

227624

Capítulo 5



CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Considerando los resultados de este estudio expuestos con anterioridad, se puede concluir lo siguiente:

Para los compuestos oxigenados:

1. Los compuestos oxigenados a una concentración de 1 g/L no generan un efecto tóxico sobre las bacterias metanogénicas acetoclásticas. Los resultados de la prueba de toxicidad con este tipo de bacterias se extrapolaron a los demás grupos de bacterias que intervienen en los procesos biológicos anaerobios cuando están presentes diferentes aceptores de electrones.
2. Los compuestos oxigenados no fueron degradados bajo las condiciones anaerobias probadas en un periodo promedio de 90 días. Esto nos indica que son compuestos persistentes con una alta estabilidad química, conferida por la presencia de una molécula de oxígeno insertada a la cadena carbonada y la presencia de un carbono terciario. Estas propiedades son la principal característica por la cual estos compuestos fueron seleccionados para ser integrados a las gasolinas limpias.
3. Otro factor determinante para lograr la degradabilidad de compuestos recalcitrantes como los compuestos oxigenados, es el tipo y fuente del inóculo. Se recomienda para estudios posteriores se empleen como inóculo suelos o sedimentos que hayan sido impactados por derrames de gasolinas o bien de los mismos compuestos, así como muestras de subsuelo y aguas subterráneas donde se tienen antecedentes de la presencia de estos compuestos.

Para los compuestos alquilfenólicos:

1. Las condiciones de metanogénesis, sulfato-reducción, desnitrificación y reducción de Fe (III) no favorecieron la degradación de los compuestos alquilfenólicos probados.
2. La mineralización de los compuestos 2-cresol y 2-etilfenol se demostró bajo condiciones de reducción de manganeso (IV). No así para el 2,6-dimetilfenol, donde se observó una degradación abiótica consecuencia de una oxidación química con el manganeso (IV) insoluble presente en el sistema.
3. La reducción del manganeso (IV) resulta una alternativa para la eliminación de los compuestos alquilfenólicos considerados muy persistentes bajo condiciones anaerobias tradicionales. Esto representa el inicio para generar tecnologías anaerobias donde el Mn (IV) en sus diferentes formas amorfas sea incorporado y reciclado dentro del mismo sistema.
4. Ampliar los estudios sobre la degradación de estos y otros compuestos alquilfenólicos utilizando el Mn (IV) como único aceptor de electrones y diferentes fuentes de inóculo, sería de gran importancia para lograr un mayor conocimiento y aportar una solución al tratamiento y destoxificación de aguas residuales que presentan este tipo de compuestos.

El compuesto AQDS no favoreció en ningún caso la degradación de compuestos recalcitrantes cuando se encontró como único aceptor de electrones, sin embargo, sí se observó que fue reducido en los sistemas donde se tenía al sedimento del río Rhin probablemente al oxidar materia orgánica ahí presente. En cuanto al mecanismo del AQDS como mediador de electrones bajo condiciones de reducción de Mn (IV) no se demostró, inclusive se observó un efecto inhibitorio en la degradación de los compuestos alquilfenólicos, 2-cresol y 2-etilfenol, que se debió a un efecto tóxico o a la competencia entre aceptores de electrones.

Finalmente, podemos decir que la degradación de un compuesto denominado como recalcitrante no está determinada únicamente por el aspecto energético de la reacción. La estructura química particular de los compuestos es fundamental, principalmente cuando se trata de compuestos con estructuras muy estables como los aromáticos y de cadena alifática ramificada. De igual manera esta condición se pone en evidencia si se compara el estado de óxido-reducción (g DQOt) de 3.55 g DQOt/g que corresponde a un alcano con 5 carbonos y de 2.51 a 2.81 g DQOt/g para los compuestos alquilfenólicos y oxigenados. De acuerdo a estos valores la oxidación de los compuestos estudiados se hubiera visto favorecida en comparación con el alcano, sin embargo, para la mayoría de los compuestos no se observó degradación en presencia de diferentes aceptores de electrones. El alcano de cadena lineal es degradado bajo condiciones anaerobias.

Capítulo 6



BIBLIOGRAFIA

Acuña-Askar, K. (1998) Biodegradation of Methyl Tert-Butyl Ether (MTBE) with Emphasis on the Bioremediation of Contaminated Sites. Tesis doctoral. Tulane University. New Orleans, L.A.

Aldrich (1998) Catálogo de productos *Sigma-Aldrich*. U. S. A.

Banerjee G. (1997) Treatment of Phenolic Wastewater in RBC Reactor. *Wat. Res.* **31(4)**: 705-714.

Battersby N. S. y Wilson V. (1989) Survey of the Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Chemicals in Digesting Sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **55(2)**: 423-439.

Benz M., Schink B. y Brune A. (1998) Humic Acid Reduction by *Propionibacterium freudenreichii* and Other Fermenting Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64(11)**: 4507-4512.

Bisaillon J.G., Lépine F., Beaudet R. y Sylvestre M. (1991) Carboxylation of o-cresol by an Anaerobic Consortium Under Methanogenic Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **57(8)**: 2131-2134.

Blum J.W.D., Hergenroeder R., Parkin F.G. y Speece R.E. (1986) Anaerobic Treatment of Coal Conversion Waste water Constituents: Biodegradability and Toxicity. *Journal WPCF.* **58(2)**: 122-131.

Borden R.C. (1994) *Handbook of Bioremediation*. En: Norris (Ed) CRC, Florida. pp. 180-183.

Bradley P.M., Chapelle F.H. y Lovley D.R. (1998) Humic Acids as Electron Acceptors for Anaerobic Microbial Oxidation of Vinyl Chloride and Dichloroethene. *Appl. Environ. Microbiol.* **64(8)**: 3102-3105.

Coates J.D., Ellis D.J., Blunt-Harris E.L., Gaw C.V., Roden E.E. y Lovley (1998) Recovery of Humic Reducing Bacteria from a Diversity of Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **64(4)**: 1504-1509.

CONCAWE (1997) The Health Hazards and Exposures Associated with Gasoline Containing MTBE. Report 97/54.

Clinton C.D., Isabelle L.M., Pankow, Rose D.L. y Tratnyek P.G. (1997) Method for Determination of Methyl tert-butyl ether and its Degradation Products in Water. *Environ. Sci. Technol.* **31(12)**: 3723-3726.

Curtis G.P. y Reinhard M. (1994) Reductive Dehalogenation of Hexachloroethane, Carbon Tetrachloride, and Bromoform by Anthrahydroquinone Disulfonate and Humic Acid. *Environ. Sci Technol.* **28**:2393-2401.

Donlon B., Razo Flores E., Field J. y Lettinga G. (1995) Toxicity of N-Substituted Aromatic to Acetoclastic Methanogenic Activity in Granular Sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3889-3893.

- Delzer C.G., Zogorsli S.J., Lopes J.T. y Bosshart L.R. (1997) Occurrence of the Gasoline Oxygenates MTBE and BTEX Compounds in Urban Stormwater in the United States. *American Chemical Society Meeting Symposium of Fuel Oxygenates*. San Francisco, Calif. 374-377.
- Environmental Protection Agency (EPA) (1997) Research Strategy for Oxygenates in Water.
- Fedorak P.M. y Hudrey S.E. (1984) The Effects of Phenol and Some Alkylphenolics on Batch Anaerobic Methanogenesis. *Wat. Res.* **18**(3): 361-367.
- Field J. y Lettinga G. (1987) The Methanogenic Toxicity and Anaerobic Biodegradability of a Hidrolizable Tannin. *Wat. Res.* **21**: 367-374.
- Fischer U. (1984) "Sulfur in Biotechnology". En: *Biotechnology Vol I*. H.J. Rhem and G. Reed. (Eds.), VCH. Alemania. Cap.15.
- Flyvbjerg J., Jorgensen C., Arvin E., Jensen B.K. y Olsen S.K. (1993) Biodegradation of ortho-cresol by Mixed Culture of Nitrate-reducing Bacteria Growing on Toluene. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(7): 2286-2292.
- Guyot J.P. (1992) Introducción a la Microbiología de los Digestores Anaerobios. *Curso de Bioprocesos Anaerobios para el Tratamiento de Efluentes Industriales*. UAM-ORSTOM-IMP.
- Hagblom M.M. y Young L.Y. (1995) Anaerobic Degradation of Halogenated Phenols by Sulfate-Reducing Consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(4): 1546-1550.
- Haner A., Hohener P., Zeyer J. (1995) Degradation of p-Xylene by a Denitrifying Enrichment Culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(8): 3185-3188.
- Hao O.J., Chen J.M., Huang L. y Buglass R.L. (1996) Sulfate-Reducing Bacteria. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **26**(1): 155-187.
- Healy Jr. J.B. y Young L.Y. (1978) Cathecol and Phenol Degradation by Methanogenic Population of Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 216.
- Heider J. y Fuchs G. (1997) Microbial Anaerobic Aromatic Metabolism. *Anaerobe*. **23**: 1-22.
- Hiscock K.M., Lloyd J.W. y Lerner D.N. (1991) Review of Natural and Artificial Denitrification of Groundwater. *Wat. Res.* **25**(9): 1099-1111.
- Holliger C. y Zehnder A. (1996) Anaerobic Biodegradation of Hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*. **7**: 326-330.
- Hyman M. y O'Reilly K. (1998) Physiological and Enzimatic Features of MTBE-Degrading Bacteria. 5th International Symposium: *In situ and On site Bioremediation*. San Diego, California.

- Hurt L. K., Wilson J.T. y Cho J. S. (1998) Anaerobic Biodegradation of MTBE in a Contaminated Aquifer. 5th International Symposium: *In situ and On site Bioremediation*. San Diego, California.
- Kang J.J., Harrison P.B., Pisarik, M.F. y Frankenberger W.T. (1998) Enhanced MTBE Biodegradation Treatability Study Under Aerobic and Anaerobic Conditions. 5th International Symposium: *In situ and On site Bioremediation*. San Diego, California.
- Kazumi J., Calwell M.E., Suflita J.M., Lovley D.R. y Young L.Y. (1997) Anaerobic Degradation of Benzene in Diverse anoxic Environments. *Environ. Sci. Technol.* **31**: 813-818.
- Kazumi J., Haggblom M.M. y Young L.Y. (1995a) Degradation of Monochlorinated and Nonchlorinated Aromatic under Iron- Reducing Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(11): 4069-4073.
- Kazumi J., Haggblom M.M. y Young L.Y. (1995b) Diversity of Anaerobic Microbial Processes in Chlorobenzoate Degradation: Nitrate, Iron, Sulfate and Carbonate as Electron Acceptors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 929-936.
- Keck A., Joachim K., Kudlich M., Stolz A., Knackmuss H.J., y Mattes R. (1997) Reduction of Azo Dyes by Redox Mediators Originating in the Naphthalenesulfonic Acid Degradation Pathway *Sphingomonas sp.* Strain BN6. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(9): 3684-3690.
- Kettunen H.R., Pulkkinen M.E. y Rintala J. (1996) Biological Treatment at Low Temperatures of Sulfur-rich Phenols containing Oil Shale Ash Leachate. *Wat. Res.* **30**(6): 1395-1402.
- Knowles R. (1982) Denitrification. *Microbiol Reviews.* **46**(1): 43-70.
- Kortekaas S. (1998) Sequenced Anaerobic-Aerobic Treatment of Hemp Pulping Wastewaters. Tesis Doctoral. Wageningen Agricultural University. Wageningen, The Netherlands.
- Klivanov A.M., Alberti B. N., Morris E.D. y Fleskin. (1980) Enzymatic Renoval of Toxic Phenols and Anilines from Wastewater. *J. Appl. Biochem.* **2**: 414-421.
- Langenhoff, A.A.M. (1997) Biodegradation of Toluene, Benzene and Naphthalene under Anaerobic Conditions. Tesis Doctoral. Wageningen Agricultural University. Wageningen, The Netherlands.
- Lovley D.R., Coates J.D., Blunt-Harris E.L., Phillips E.J. y Woodward J.C. (1996) Humic Substances as Electron Acceptors for Microbial Respiration. *Nature.* **382**: 445-448.
- Lovley D.R. y Lonergan D.J. (1990) Anaerobic Oxidation of Toluene, Phenol and *p*-Cresol by the Dissimilatory Iron-Reducing Organism, GS-15. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(6): 1858-1864.
- Lovley D.R. y Phillips E.J. (1988) Novel Mode of Microbial Energy Metabolism: Organic Carbon Oxidation Coupled to Dissimilatory Reduction of Iron or Manganese. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**(6): 1472-11480.

- Lutz E.H. (1996) *Geomicrobiology*. Dekker Marcel Inc., 3a edición N.Y. Cap. 11,14,15,17.
- Mijaylova Nacheva P. (1993) Tratamiento de Aguas Residuales Industriales. *Memorias del Curso de Limnología Aplicada*. Distrito Federal, México.
- Mormille M. R., Liu S. y Suflita J.M. (1996) Toxicity of Selected Gasoline Components to Glucose Methanogenesis by Aquifer Microorganisms. *Anaerobe*. 2: 299-303.
- Mormille 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(9): 1727-1732.
- Nakamura N. D. (1995) MTBE is experiencing a global shift. *Hydrocarbon processing*. 4(12):19
- Nealson K.H. y Myers C.R. (1992) Microbial Reduction of Manganese and Iron: New Approaches to Carbon Cycling. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(2): 439-443.
- Pfenning N. y H. Biebl (1981) The Dissimilatory Sulfur-Reducing Bacteria en: M.P. Starr, H.G. Trueper, H. Stolp, A. Balows y H.G. Schlegel, (Eds). *The Prokaryotes. Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria Vol. 1* Springer Verlag. Berlín, 941-947.
- Petróleos Mexicanos (1998) Anuario Estadístico de PEMEX. Gerencia Corporativa de Evaluación e Información. Distrito Federal, México.
- Ramanand K. y Suflita J.M. (1991) Anaerobic Degradation of m-cresol in Anoxic Aquifer Slurries: Carboxylation Reactions in a Sulfate-Reducing Bacterial Enrichment. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(6): 1689-1695.
- Razo Flores E., Donlon B.A., Field J.A. y Lettinga G. (1996) Biodegradability of N-substituted Aromatics and Alkylphenols under Methanogenic Conditions Using Granular Sludge. *Wat Sci. Tech.* 33(3): 47-57
- Razo Flores E. (1997) Biotransformation and Biodegradation of N-sustituted Aromatics in Methanogenic Granular Sludge. Tesis Doctoral. Wageningen Agricultural University. Wageningen, The Netherlands.
- Reindhard M. (1994) *Handbook of Bioremediation*. Norris (Ed),CRC, Florida. pp. 134-136.
- Ruskin J., Goronszy M., Eckenfelder W.W. y Froelich E. (1992) Water. *Chemical Engineering*. June: 79-83.
- Schie P.M. y Young L.Y. (1998) Isolation and Characterization of Phenol-Degrading Denitrifying Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(7): 2432-2438.
- Sierra R. y Lettinga G. (1991) The Effect of Aromatic Structure on the Inhibition of Acetoclastic Methanogenesis in Granular Sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34: 544- 550.

- Smith M.R. (1990) The Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. *Biodegradation*. 1:191-206.
- Sorensen H.B. y Jorgensen S.E. (1993) Studies in Environmental Science: The Removal of Nitrogen Compounds from Wastewater. Elsevier. pp.119 -151.
- Soubes M. (1994) Microbiología de la Digestión Anaerobia. *Memorias del III Taller y Seminario Latinoamericano de Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales*. Montevideo-Uruguay.
- 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.
- Stern B.R. y Kneiss J.J. (1997) Methyl *tert*-Butyl Ether: Use as an Oxygenate in Fuels. *Journal of Applied Toxicology MTBE supplement Wiley*.17(S1).
- Suflita J.M., Liang L y Saxena A. (1989) The Anaerobic Biodegradation of *o*, *m* y *p*-cresol by Sulfatereducing Bacterial Enrichment Cultures Obtained From Shallow Anoxic Aquifer. *Journal of Industrial Microbiology*. 4: 255-266.
- Suflita J. M. y Mormille M.R. (1993) Anaerobic Biodegradation of Known and Potential Gasoline Oxygenates in the Terrestrial Subsurface. *Environ. Sci. Technol.* 27: 976-978.
- Thauer R.K., Jungermann K. Y Decker K. (1977) Energy Conservation in Chemotrophic an Anaerobic Bacteria. *Bacterial Rev.* 41: 100-180.
- Verschueren K. (1977) *Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals*. Van Nostrand Reinhold Co. New York .
- Visser A. (1995) The Anaerobic Treatment of Sulfate Containing Wastewater. Tesis Doctoral. Wageningen Agricultural University. Wageningen, The Netherlands.
- Villemur R. (1995) Coenzyme A ligases Involved in Anaerobic Biodegradation of Aromatic Compounds. *Can. J. Microbiol.* 41:855-861.
- Yeh C.K. y Novak J.T. (1994) Anaerobic Biodegradation of Gasoline Oxygenates in Soils. *Water Environ. Res.* 66(5): 744-752.
- Young L.M. y Rivera M.D. (1985) Methanogenic Degradation of Four Phenolic Compounds. *Water Res.* 19(10): 1325-1332.

227624

ANEXOS



I Relaciones estequiométricas de las reacciones de óxido-reducción

| Metanogénesis | | |
|----------------------|---|-------------------------|
| FENOL | $C_6H_6O + 4 H_2O \longrightarrow$ | $3.5 CH_4 + 2.5 CO_2$ |
| CRESOL | $C_7H_8O + 4.5 H_2O \longrightarrow$ | $4.25 CH_4 + 2.75 CO_2$ |
| XILENOL ETILFENOL | $C_8H_{10}O + 5 H_2O \longrightarrow$ | $5 CH_4 + 3 CO_2$ |
| TBA | $C_4H_{10}O + H_2O \longrightarrow$ | $3 CH_4 + CO_2$ |
| MTBE | $C_5H_{12}O + 1.5 H_2O \longrightarrow$ | $3.75 CH_4 + 1.25 CO_2$ |
| TAME ETBE | $C_6H_{14}O + 2 H_2O \longrightarrow$ | $4.5 CH_4 + 1.5 CO_2$ |

| Sulfato-reducción | | |
|----------------------|--|--------------------------------|
| FENOL | $C_6H_6O + 3.5 SO_4^{-2} + H^+ + 3 H_2O \longrightarrow$ | $6 HCO_3^- + 3.5 H_2S$ |
| CRESOL | $C_7H_8O + 4.25 SO_4^{-2} + 1.5H^+ + 3 H_2O \longrightarrow$ | $7 HCO_3^- + 4.5 H_2S$ |
| XILENOL ETILFENOL | $C_8H_{10}O + 5 SO_4^{-2} + 1.75 H^+ + 3 H_2O \longrightarrow$ | $8 HCO_3^- + 5 H_2S$ |
| TBA | $C_4H_{10}O + 3 SO_4^{-2} + 2 H^+ \longrightarrow$ | $4 HCO_3^- + 3 H_2S + H_2O$ |
| MTBE | $C_5H_{12}O + 3.75 SO_4^{-2} + 2.5 H^+ \longrightarrow$ | $5 HCO_3^- + 3.75 H_2S + H_2O$ |
| TAME ETBE | $C_6H_{14}O + 4.5 SO_4^{-2} + 3 H^+ \longrightarrow$ | $6 HCO_3^- + 4.5 H_2S + H_2O$ |

Desnitrificación

| | | |
|-----------|---|--------------------------------|
| FENOL | $C_6H_6O + 5.6 NO_3^- + 5.6 H^+ \longrightarrow$ | $6 CO_2 + 2.8 N_2 + 5.8 H_2O$ |
| CRESOL | $C_7H_8O + 6.8 NO_3^- + 6.8 H^+ \longrightarrow$ | $7 CO_2 + 3.4 N_2 + 7.4 H_2O$ |
| XILENOL | | |
| ETILFENOL | $C_8H_{10}O + 8 NO_3^- + 8 H^+ \longrightarrow$ | $8 CO_2 + 4 N_2 + 9 H_2O$ |
| TBA | | |
| | $C_4H_{10}O + 4.8 NO_3^- + 4.8 H^+ \longrightarrow$ | $4 CO_2 + 2.4 N_2 + 7.4 H_2O$ |
| MTBE | | |
| | $C_5H_{12}O + 6 NO_3^- + 6 H^+ \longrightarrow$ | $5 CO_2 + 3 N_2 + 9 H_2O$ |
| TAME | | |
| ETBE | $C_6H_{14}O + 7.2 NO_3^- + 7.2 H^+ \longrightarrow$ | $6 CO_2 + 3.6 N_2 + 10.6 H_2O$ |

Reducción del Fe (III)

| | | |
|-----------|---|-----------------------------------|
| FENOL | $C_6H_6O + 28 Fe^{+3} + 17 H_2O \longrightarrow$ | $6 HCO_3^- + 28 Fe^{+2} + 34 H^+$ |
| CRESOL | $C_7H_8O + 34 Fe^{+3} + 20 H_2O \longrightarrow$ | $7 HCO_3^- + 34 Fe^{+2} + 41 H^+$ |
| XILENOL | | |
| ETILFENOL | $C_8H_{10}O + 40 Fe^{+3} + 23 H_2O \longrightarrow$ | $8 HCO_3^- + 40 Fe^{+2} + 48 H^+$ |
| TBA | | |
| | $C_4H_{10}O + 24 Fe^{+3} + 11 H_2O \longrightarrow$ | $4 HCO_3^- + 24 Fe^{+2} + 28 H^+$ |
| MTBE | | |
| | $C_5H_{12}O + 30 Fe^{+3} + 14 H_2O \longrightarrow$ | $5 HCO_3^- + 30 Fe^{+2} + 35 H^+$ |
| TAME | | |
| ETBE | $C_6H_{14}O + 36 Fe^{+3} + 17 H_2O \longrightarrow$ | $6 HCO_3^- + 36 Fe^{+2} + 42 H^+$ |

Reducción del Mn (IV)

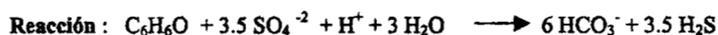
| | | |
|-----------|---|-----------------------------------|
| FENOL | $C_6H_6O + 14 Mn^{+4} + 17 H_2O \longrightarrow$ | $6 HCO_3^- + 14 Mn^{+2} + 34 H^+$ |
| CRESOL | $C_7H_8O + 17 Mn^{+4} + 20 H_2O \longrightarrow$ | $7 HCO_3^- + 17 Mn^{+2} + 41 H^+$ |
| XILENOL | | |
| ETILFENOL | $C_8H_{10}O + 20 Mn^{+4} + 23 H_2O \longrightarrow$ | $8 HCO_3^- + 20 Mn^{+2} + 48 H^+$ |
| TBA | | |
| | $C_4H_{10}O + 15 Mn^{+4} + 11 H_2O \longrightarrow$ | $4 HCO_3^- + 15 Mn^{+2} + 28 H^+$ |
| MTBE | | |
| | $C_5H_{12}O + 12 Mn^{+4} + 14 H_2O \longrightarrow$ | $5 HCO_3^- + 12 Mn^{+2} + 35 H^+$ |
| TAME | | |
| ETBE | $C_6H_{14}O + 18 Mn^{+4} + 17 H_2O \longrightarrow$ | $6 HCO_3^- + 18 Mn^{+2} + 42 H^+$ |

II Metodología empleada para el cálculo del cambio de energía libre de Gibbs (ΔG°)

El cálculo del cambio de energía libre de Gibbs se realizó en base a las relaciones estequiométricas de las reacciones de óxido-reducción, que se presentan en el anexo I. De la misma forma se emplearon los datos correspondientes a la energía libre de formación, reportadas por Thauer *et al.* (1977), de cada una de las especies involucradas.

$$\Delta G^\circ = \Sigma \Delta G^\circ_p - \Sigma \Delta G^\circ_r$$

Por ejemplo, en el caso de la oxidación del compuesto fenol acoplada a la reducción del ión sulfato:



Datos (kcal/mol):

$$SO_4^{-2} = 177.97$$

$$C_6H_6O = 11.38$$

$$H_2S(g) = 8.02$$

$$H_2O(l) = 56.687$$

$$H^+ = 0$$

$$HCO_3^- = 140.26$$

Por lo tanto:

$$\Delta G^\circ = \Sigma \Delta G^\circ_p - \Sigma \Delta G^\circ_r = [6(140.26) + 3.5(8.02)] - [11.38 + 3.5(177.97) + 0 + 3(56.687)]$$

$$\Delta G^\circ = 869.63 - 804.23 = -65.4$$