



**UNIVERSIDAD AUTONOMA
METROPOLITANA**

UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Y DE LA SALUD

**Degradación de 2-Clorofenol bajo condiciones de
sulfato-reducción en un reactor UASB**

TESIS PARA OBTENER LA
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA
PRESENTA

B. E. Jose Luis Cano Velasco.

DIRECTORA DE TESIS:
Dra. Mónica Meraz Rodríguez

México, D.F. 17 de mayo de 2010.

Iztapalapa, D. F. a 16 de julio de 2010

De acuerdo al Comité Tutorial se acepta la Tesis:

**Degradación de 2-Clorofenol bajo condiciones de sulfato reducción en un reactor
UASB.**

Que presenta

B. E. Jose Luis Cano Velasco

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MONICA ALICIA MERÁZ RODRIGUEZ

UAM-IZTAPALAPA



LECTORA DE TESIS

DRA. PATRICIA CASTILLA HERNANDEZ

UAM-XOCHIMILCO



人莫強如喫喝、且在勞碌中享福。我看這也是出於神的手。

Non v'è nulla di meglio per l'uomo del mangiare, del bere, e del far godere all'anima sua il benessere in mezzo alla fatica ch'ei dura; ma anche questo ho veduto che viene dalla mano di Dio.

בדב קהלת

AGRADECIMIENTOS



Se agradece al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal por la beca BI-080530102107, otorgada para la realización de este proyecto y asimismo al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento otorgado a este trabajo y que es parte del proyecto: “Análisis fisiológico y poblacional de procesos respiratorios microbianos para la eliminación de clorofenol del agua”.

Proyecto CONACYT 3566

| ÍNDICE | Página |
|---------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Agradecimientos | 3 |
| Índice | 4 |
| Lista de figuras | 7 |
| Lista de tablas | 8 |
| Notación | 9 |
| 1. Introducción | 11 |
| 2. Antecedentes | 14 |
| 3. Justificación | 16 |
| 4. Hipótesis | 16 |
| 5. Objetivos | 16 |
| 5.1. Objetivo general | 16 |
| 5.2. Objetivos particulares | 16 |
| 6. Materiales y métodos | 17 |
| 6.1 Enriquecimiento del cultivo | 17 |
| 6.1.1 Inóculo | 17 |
| 6.1.2 Reactor UASB | 17 |
| 6.1.2.1 Condiciones de arranque del reactor UASB | 17 |
| 6.1.2.2 Enriquecimiento del cultivo de BSR con Benzoato, Fenol y 2-CF | 18 |
| 6.1.3 Medio de cultivo | 19 |
| 6.1.4 Toma de muestras | 20 |
| 6.1.5. Técnicas analíticas | 20 |
| 6.1.5.1 Compuestos azufrados | 20 |
| 6.1.5.1.1 Sulfato | 20 |
| 6.1.5.1.2 Sulfuro | 21 |
| 6.1.5.2 Compuestos carbonados | 21 |
| 6.1.5.2.1 Benzoato, Fenol y 2-CF | 21 |
| 6.1.5.2.2 Acetato | 21 |
| 7. RESULTADOS | 22 |
| 7.1. Enriquecimiento del cultivo | 22 |
| 7.1.1 Especies azufradas | 22 |
| 7.1.2 Especies carbonadas | 23 |
| 7.1.2.1 Benzoato | 23 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| 7.1.2.2 Fenol | 23 |
| 7.1.2.3 2-CF | 24 |
| 7.1.3 Balance de electrones | 25 |
| 7.1.4. Balance de masa | 25 |
| 7.1.5 Conclusiones parciales | 26 |
| 7.2 Segunda condición | 26 |
| 7.2.1 Especies azufradas | 26 |
| 7.2.2 Especies carbonadas | 27 |
| 7.2.2.1 Benzoato | 27 |
| 7.2.2.2 Fenol | 28 |
| 7.2.2.3 2-CF | 28 |
| 7.2.3 Balance de electrones | 29 |
| 7.2.4 Balance de masa | 30 |
| 7.2.5 Conclusiones parciales | 30 |
| 7.3 Tercera condición. | 30 |
| 7.3.1 Compuestos azufrados | 30 |
| 7.3.2 Especies carbonadas | 31 |
| 7.3.2.1 Benzoato | 31 |
| 7.3.2.2 Fenol | 32 |
| 7.3.2.3 2-CF | 32 |
| 7.3.3 Balance de electrones | 33 |
| 7.3.4 Balance de masa | 34 |
| 7.3.5 Conclusiones parciales | 34 |
| 7.3.6 Resumen de resultados | 35 |
| 7.4 pH | 36 |
| 7.5 Acetato | 36 |
| 8. Conclusiones generales | 38 |
| 9. Bibliografía | 39 |
| 10. Anexos | 42 |
| 10.1. Curva estándar para sulfato (KOLLMERT, 2000) | 42 |
| 10.2. Curva estándar para sulfuro (CORD-RUWISH, 1985) | 44 |
| 10.3 Curva estándar para los compuestos carbonados (HPLC) | 45 |
| 10.3.1 Curva estándar de benzoato (HPLC) | 46 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| 10.3.2.1 Curva estándar de fenol (HPLC) | 47 |
| 10.3.3.1 Curva estándar de 2-CF (HPLC) | 47 |
| 11 Cálculos | 49 |
| 11.1.1 Operación del reactor | 49 |
| 11.1.2 Carga orgánica volumétrica (BV) | 49 |
| 11.1.3 Relación demanda química de oxígeno/sulfato | 49 |
| 11.1.4 Gasto (G) | 49 |
| 11.1.4.1. Primera condición | 49 |
| 11.1.4.2. Segunda condición | 49 |
| 11.1.5 Inóculo del reactor UASB | 49 |
| 11.1.6 Concentración de sulfato | 49 |
| 11.1.6.1. Primera condición | 49 |
| 11.1.6.2. Segunda condición | 50 |
| 11.2 Concentración para la alimentación de cada compuesto de la mezcla | 50 |
| 11.2.1.1 Benzoato (g) | 50 |
| 11.2.1.2 Fenol (g) | 51 |
| 11.2.1.3 2-CF (g) | 51 |
| 11.3 Proporción del benzoato para cada condición | 52 |
| 11.3.1 Primera condición | 52 |
| 11.3.2 Segunda condición | 52 |
| 11.3.3 Tercera condición | 52 |
| 11.4 Proporción del fenol para cada condición | 52 |
| 11.4.1 Primera condición | 52 |
| 11.4.2 Segunda condición | 53 |
| 11.4.3 Tercera condición | 53 |
| 11.5 Proporción del 2-CF para cada condición | 53 |
| 11.5.1 Primera condición | 53 |
| 11.5.2 Segunda condición | 53 |
| 11.5.3 Tercera condición | 54 |
| 12. Trabajos presentados en congresos | 55 |

| Lista de figuras | Página |
|--------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Figura 1.- Estructura química del 2-CF | 11 |
| Figura 2. Comportamiento del reactor con sulfato | 22 |
| Figura 3. Consumo de benzoato | 23 |
| Figura 4. Consumo de fenol | 24 |
| Figura 5. 2-CF en el influente y efluente del reactor | 24 |
| Figura 6. Comportamiento del sulfato y sulfuro | 27 |
| Figura 7. Consumo de benzoato al 75% | 27 |
| Figura 8. Fenol en el influente y el fluente al 15% | 27 |
| Figura 9. 2-CF en el influente y el efluente, al 10% | 27 |
| Figura 10. Perfil de consumo de sulfato (DQO/SO ₄ de 0.6) | 31 |
| Figura 11. Benzoato proporción alimentada en la mezcla del 30% | 31 |
| Figura 12. Fenol proporción alimentada en la mezcla del 52.6% | 32 |
| Figura 13. 2-CF proporción en la mezcla de l 7.4% | 33 |
| Figura 14. pH | 36 |
| Figura 15. Acetato | 37 |
| Figura 16.- Curva estándar de sulfato | 44 |
| Figura 17. Curva estándar de sulfuro | 45 |
| Figura 18. Curva estándar de benzoato | 46 |
| Figura 19. Curva estándar de fenol | 47 |
| Figura 20. Curva estándar de 2-CF | 48 |

| Lista de tablas | Página |
|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Tabla 1. Reacciones en la sulfato reducción | 13 |
| Tabla 2. Condiciones de arranque del reactor | 17 |
| Tabla 3. Condiciones de operación | 18 |
| Tabla 4. Composición del medio de cultivo Visser | 19 |
| Tabla 5. Solución de oligoelementos traza | 20 |
| Tabla 6. Balance de electrones | 25 |
| Tabla 7. Balance de masa para el benzoato, fenol, sulfato y sulfuro | 26 |
| Tabla 8. Balance de electrones a partir de benzoato y fenol | 29 |
| Tabla 9. Balance de masa para el benzoato, fenol, sulfato y sulfuro | 30 |
| Tabla 10. Balance de electrones realizado a partir de benzoato y fenol | 33 |
| Tabla 11. Balance de masa para el benzoato, fenol, sulfato y sulfuro | 34 |
| Tabla 12. Resumen de los resultados (compuestos azufrados) | 35 |
| Tabla 13. Resumen de los resultados (benzoato) | 35 |
| Tabla 14. Resumen de los resultados (fenol) | 35 |
| Tabla 15. Resumen de los resultados (2-CF) | 35 |
| Tabla 16. Valores teóricos de formación de acetato y porcentaje recuperado | 37 |
| Tabla 17. Soluciones en la elaboración de la curva estándar de Sulfato | 43 |
| Tabla 18. Soluciones en la elaboración de la curva estándar de Sulfuro | 44 |
| Tabla 19. Condiciones de operación del cromatógrafo HPLC | 46 |

Notación

2-CF: 2-Clorofenol.

μ : Micra.

AlCl_3 : Tricloruro de aluminio.

BaCl_2 : Cloruro de bario.

BaSO_4 : Sulfato de bario.

BSR: Bacterias Sulfato Reductoras.

Bv: Carga orgánica volumétrica.

CaCl_2 : Dicloruro de calcio.

CG: Cromatografía de gases.

CO_2 : Dióxido de Carbono.

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: Dicloruro de cobalto hexahidratado.

$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: Dicloruro de cobre dihidratado.

CuS : Sulfuro de cobre.

CuSO_4 : Sulfato de cobre.

DQO: Demanda Química de Oxígeno.

$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: Dicloruro ferroso tetrahidratado.

G: Gasto.

H_2 : Hidrógeno Molecular.

H_2S : Sulfuro de hidrógeno.

H_3BO_3 : Ácido bórico.

HCl. Ácido clorhídrico.

HPLC: Cromatografía de líquidos de alta resolución.

KCl: Cloruro de potasio.

MgSO_4 : Sulfato de magnesio.

mm: Milímetro.

mmol: Milimol.

mM: Milimolar FID: Detector de ionización de flama.

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: Dicloruro de manganeso tetrahidratado.

N_2 : Nitrógeno Molecular.

NaCl: Cloruro de sodio.

$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$: Sulfuro de sodio nonahidratado.

Na_2SO_4 : Sulfato de sodio.

Na_2SeO_3 : Selenito de sodio.

NaH_2PO_4 : Fosfato monobásico de sodio.

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$: Heptamolibdato de amonio.

NH_4Cl : Cloruro de amonio.

nm: Nanomoles.

$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: Dicloruro de níquel hexahidratado.

pH: Potencial Hidrógeno.

PSI: Unidad de presión, Pounds per Square Inch, libras por pulgada cuadrada.

rpm: Revoluciones por minuto.

S- HS^- : Azufre del sulfuro de hidrógeno.

SO_4^{2-} : Sulfato.

S- SO_4^{-2} : Azufre del sulfato.

SSV: Sólidos Suspendidos Volátiles.

TRH: Tiempo de retención hidráulica.

UASB: Upflow Anaerobic Sludge Blanket, Cama de de lodo de Flujo Ascendente.

UV: Ultravioleta:

V_R : Volumen del reactor.

WHO: World Health Organization, Organización Mundial de la Salud.

ZnCl_2 : Dicloruro de zinc.

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, se ha intensificado el interés en cuanto a la calidad del ambiente, principalmente del agua, esto se debe a que su contaminación es un riesgo eminente a la salud humana. Una estrategia para minimizar el impacto ambiental ha sido crear normas rigurosas para controlar las descargas de compuestos altamente tóxicos a cuerpos receptores de aguas residuales, así también para prevenir la presencia de dichos compuestos en el agua potable disponible para la población.

Sustancias como son los pesticidas organoclorados se encuentran distribuidos en ambientes terrestres y acuáticos, como resultado de su uso constante para combatir plagas en actividades industriales y agrícolas, así como en campañas sanitarias en donde son utilizados para contrarrestar enfermedades como la malaria. Por sus propiedades fisicoquímicas estos compuestos son recalcitrantes motivo por el que resisten la degradación biológica. Debido a su amplia distribución y difícil biodegradación, estos contaminantes representan una amenaza para la biota en general, siendo compuestos altamente tóxicos que pueden causar: mutagénesis, teratogénesis, además de una gran variedad de alteraciones en las rutas metabólicas (Goldberg, 1995).

Entre los compuestos organoclorados se encuentran los clorofenoles, compuestos de gran importancia económica, ya que son ampliamente utilizados en la industria y en la agricultura, como precursores de productos farmacéuticos, tinturas, pesticidas, productos químicos, en el tratamiento de la preservación de la madera, etc., todo esto por su capacidad de inhibición del crecimiento microbiano. Dentro de este grupo, se encuentra el 2-Clorofenol (2-CF; ver Figura 1), compuesto que sirve de materia prima para la síntesis de clorofenoles de mayor complejidad y que se produce en el proceso de blanqueamiento de la pulpa de papel, siendo de estos, el más persistente (Liu y Pacepavicius, 1990).

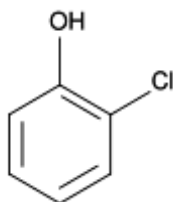


Figura 1.- Estructura química del 2-CF.

Las fuentes más importantes de contaminación de clorofenoles y por lo tanto de 2-CF, la constituyen el uso indiscriminado de pesticidas, tratamiento de maderas, descargas de aguas residuales provenientes de la industria del papel, de plantas de gas, de carbón, siderurgias y refinerías de petróleo, cloración de las aguas e incineración inapropiada de residuos orgánicos, produciéndose dioxinas y/o dibenzofurano, productos químicos de los más tóxicos existentes en la actualidad, que representan un peligro potencial para el ambiente y las personas que puedan en forma directa o indirecta estar en contacto con este tipo de compuestos. Se sabe también que puede producirse 2-CF en el agua potable por la reacción de ácido fenólico presente en esta y el cloro utilizado como desinfectante; también algunas plantas de tratamiento utilizan el 2-CF para controlar el crecimiento de biomasa dentro del proceso y este no se elimina (WHO, 2003; Torres-Alvarado y Calva, 2002; WHO, 1987).

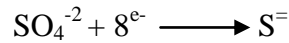
Esta clase de compuestos también pueden ingresar al sistema acuático por descargas, arrastre, infiltración y erosión de los suelos. El lavado de dichos suelos hace que alcancen los ríos, así como ecosistemas costeros y marinos provocando efectos nocivos sobre los organismos.

Se han hecho diversos estudios sobre la eliminación de estos compuestos en el agua, y no se han propuesto tratamientos específicos. Entre los tratamientos estudiados se encuentran los fisicoquímicos y los biológicos, los primeros no representan una solución real al problema ya que en algunos casos pueden generar sustancias que son más tóxicas o producir lodos químicos que se consideran residuos peligrosos, por lo que solamente se traslada el problema de un lugar a otro.

Los tratamientos biológicos ofrecen una mejor opción ya que cuentan con diferentes procesos que se pueden emplear, uno de ellos es la sulfato reducción. En este proceso los compuestos oxidados del azufre son reducidos biológicamente, principalmente de sulfato a sulfuro, por lo que se requieren condiciones anóxicas que permitan la oxido-reducción; los donadores de electrones, en este caso pueden ser diversos compuestos contaminantes. Esta reacción es llevada a cabo por las bacterias sulfato reductoras (BSR), microorganismos que se agrupan en varios géneros.

Las BSR utilizan compuestos oxidados del azufre (sulfato, tiosulfato, sulfito y azufre elemental) como aceptores de electrones en un proceso respiratorio anaerobio desasimilativo, sin incorporación del azufre en compuestos orgánicos. La reducción de los sulfoxianiones resulta en la producción de sulfuro, el estado más reducido del azufre, que presenta olor desagradable, toxicidad y produce

importantes problemas de corrosión, en una reacción que involucra la transferencia de 8 electrones entre el compuesto oxidado y el producto reducido:



Los donadores de electrones utilizados para llevar a cabo el proceso sulfato reductor son variados y pueden ser orgánicos: formiato, propionato, lactato, acetato, etanol, etc., y son utilizados por las BSR organotróficas, mientras las litotróficas utilizan el CO₂ como fuente de carbono y los electrones son obtenidos del H₂ (Widdel, 1988). Debido a estas reacciones, las BSR son consideradas como marcadores ambientales ya que al encontrar sulfuro en un sitio, se infiere que está contaminado con materia orgánica indeseable.

Los principales productos de las BSR son el H₂S y CO₂ en una relación 2:1, así como hidrógeno, por la actividad de las enzimas hidrogenasas y los citocromos involucrados en su sistema respiratorio. Se ha reportado que estas bacterias son capaces de oxidar algunos clorofenoles por deshalorespiración, esto implica la transferencia de dos electrones a partir de un donador endógeno al anillo aromático. Lo que provoca la sustitución del halógeno por un protón, la cual también depende del estado redox de la molécula, ya que muchos compuestos halogenados tienen un estado más oxidado que sus homólogos no halogenados y tienden a aceptar electrones y ser deshalogenados reductivamente. Este proceso se lleva a cabo por vías desasimilativas y genera energía para las células (De Weerd y Suflita, 1991). Por otra parte se ha demostrado que la deshalogenación de clorofenoles se lleva a cabo antes que el fenol resultante se oxide, además este proceso es acompañado de la producción de sulfuro. También se sabe que existe la formación de 3-Clorobenzoato que debe deshalogenarse antes de actuar como donador de electrones en la sulfato reducción (Becker y col.1999; Mohn y Tiedje, 1992; King, 1988). Las reacciones principales involucradas en la degradación de estos compuestos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Reacciones involucradas en la sulfato reducción para cada uno de los compuestos estudiados.

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Reducción del sulfato a sulfuro | |
| $\text{SO}_4^{2-} + 8\text{H}^+ + e^- \rightarrow \text{H}_2\text{S} + 4\text{H}_2\text{O}$ | |
| Deshalogenación reductiva del 2-CF y producción de fenol: | |
| $\text{C}_6\text{H}_4\text{OHCl} + \text{H}_2 \rightarrow \text{C}_6\text{H}_5\text{OH} + \text{HCl}$ | |
| Carboxilación de fenol a benzoato (reacción reversible): | |
| $\text{HOC}_6\text{H}_4\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O}$ | $\rightleftharpoons \text{C}_6\text{H}_5\text{OH} + \text{HCO}_3^-$ |
| | $\xrightarrow{\text{H}_2} \text{6H}_5\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O}$ |
| Acetogénesis a partir de benzoato: | |
| $\text{C}_6\text{H}_5\text{COO}^- + 7\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 3\text{CH}_3\text{COO}^- + 3\text{H}_2 + 3\text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ | |

En México es una realidad que el control de descargas de contaminantes es insuficiente, además, faltan procedimientos adecuados para el tratamiento de los residuos tóxicos y recalcitrantes producidos

por la industria, entre ellas las del papel. Problema que se vuelve sumamente importante abordar para la Ciudad de México ya que la mayoría de las industrias se encuentran aquí y en el área metropolitana, así pues se debe incentivar el desarrollo de nuevos tratamientos de efluentes para asegurar un bajo nivel de contaminantes en los cuerpos receptores.

2. ANTECEDENTES

En condiciones anaerobias se ha estudiado la degradación de una amplia variedad de clorofenoles (Becker y col., 2005; Atuanya y Chakrabarti, 2004 y 2003; Milligan y Häggblom, 2001), así como de fenoles (Boyd y col., 1983). En estos estudios observaron que en mezcla, estos compuestos son más tóxicos y que la toxicidad también se ve incrementada por la posición del cloro en la molécula, además encontraron que en la degradación de estos compuestos y sus intermediarios intervienen varios grupos de bacterias. Boyd y Shelton (1984), reportaron que el 2,4-Diclorofenol y 3,5-Diclorofenol fueron deshalogenados rápidamente por un lodo metanogénico aclimatado a clorofenoles. Un efecto similar se encontró al adicionar una fuente de electrones alterna durante la degradación de 2,4,5 Triclorofenol (Gibson y Suflita, 1993 y 1990).

La degradación de clorofenoles por sulfato reducción sigue vías similares a la metanogénesis, debido a que el primer paso es la sustitución de Cl^- por H^+ , proceso denominado deshalogenación reductiva (Kuhn y col., 1990; Gibson y Suflita, 1986). Se ha observado que en este proceso podría intervenir el H_2 como donador de electrones (Ehlers y Rose, 2006), por lo que se pueden acoplar la deshalogenación y la sulfato reducción en un mismo proceso (Townsend y col., 1997).

En otro estudio se encontró que los clorofenoles son degradados rápidamente cuando se utiliza un lodo previamente adaptado a estos compuestos (Häggblom y Young, 1990; Kohring y col., 1989). Häggblom y Young (1995) observaron la completa mineralización de clorofenoles hasta CO_2 utilizando un lodo previamente alimentado con una mezcla de clorofenoles por un largo periodo de tiempo.

Basu y col., (1996), estudiaron el efecto de tres inóculos: lodo de aguas residuales anaeróticamente digeridos, **sedimentos de una laguna aereada provenientes de una fábrica de blanqueo de papel** (sediment from a bleached kraft mill aerated lagoon) y , así como su potencial para deshalogenar 0.38 mM de 2-CF en cultivos anaerobios en lote. Emplearon medio mineral enriquecido con 0.1% de extracto de levadura y atmosferas modificadas de $\text{CO}_2\text{-N}_2$ (20% + 80%) y $\text{CO}_2\text{-H}_2$ (20% + 80%). Encontraron que la deshalogenación ocurre después de periodos largos de fase lag que van desde 97 a

250 días. Encontraron que el fenol es un producto intermediario degradado por la ruta del benzoato, asimismo observaron que todos los cultivos incrementan la velocidad de deshalogenación significativamente después de una reinoculación con medio más 2-CF y extracto de levadura. También observaron una mayor eficiencia de deshalogenación en los cultivos que tuvieron como inóculo lodo digestor de aguas residuales con la atmósfera modificada por la mezcla CO₂-N₂ que con la mezcla CO₂-H₂. El lodo digestor adaptado a 2-CF por más de un año convirtió 2-CF (0.38 mM) a fenol rápidamente. También mencionan que la actividad de deshalogenación del lodo adaptado no mostró un incremento lineal respecto a la concentración de biomasa. Por último de cuatro fuentes de carbono probadas, el extracto de levadura al 0.1% fue el sustrato preferido por el consorcio.

Mohn y Tiedje (1992), encontraron que la transferencia de electrones para la deshalogenación del 3-Clorobenzoato y la reducción del sulfato, se acoplan a la producción de ATP y con la adición de un donador de electrones se obtiene una disminución en el pH debido probablemente a la extrusión de protones a través de la membrana mitocondrial. Esto indica que las células pueden beneficiarse energéticamente con la transferencia de electrones a compuestos halogenados, aunque el rendimiento del crecimiento microbiano sea bajo. En otro estudio llevado a cabo por Dolfing y Harrison (1992), observaron que la magnitud del cambio en la energía libre estándar por la oxidación de hidrógeno usado en compuestos organoclorados como aceptores de electrones, puede derivar más energía que los aceptores comunes encontrados en ambientes anóxicos, incluyendo el SO₄²⁻.

Otros compuestos halogenados contaminantes que han sido oxidados bajo sulfato reducción con la generación de sulfuro son el Tetracloroetileno, Tricloroetileno y Hexacloroetano (Beeman y col., 1983), así como el 3- y 4-Clorofenol, utilizando enriquecimientos de sedimentos marinos o cepas puras y en ambos casos se emplearon diferentes donadores de electrones orgánicos para acoplar la deshalorespiración con la oxidación del anillo aromático hasta acetato (Sun y col., 2000).

Beristain y col., (2007), encontraron bajo condiciones anaerobias desnitrificantes que el 2-CF se mineralizó, detectando intermediarios transitorios como: fenol, benzoato y acetato. Por otra parte Sarathi-Majumder y Gupta (2005), mencionan que la aclimatación de un lodo colectado de un digestor anaeróbico e inoculado en un reactor UASB alimentado con 30 mg/L de 2-CF, tomó 190 días para ser deshalogenado.

3. JUSTIFICACIÓN

El 2-CF es uno de los compuestos que muestran toxicidad para la salud y el ambiente, además de ser un compuesto recalcitrante, por lo que es necesario se lleven a cabo estudios complementarios acerca de la degradación de este tipo de compuesto, ya que puede alterar los ciclos biogeoquímicos naturales de los cuerpos de agua.

4. HIPÓTESIS

Debido a que el benzoato, el fenol y 2-CF se presentan como intermediarios de la misma ruta de mineralización, al alimentar el cultivo de BSR con fenol y benzoato se puede inducir la oxidación de ambos para adaptar a las bacterias a compuestos más tóxicos como lo es el 2-CF, dado que pueden actuar como inductores de la sulfato reducción y esto a su vez favorecerá la deshalogenación reductiva del tóxico, con lo que todo el proceso se verá estimulado.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la degradación de 2-CF en un reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente (UASB) sulfato reductor alimentado en continuo y a diferentes velocidades de carga.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Enriquecer un cultivo de bacterias, de condiciones metanogénicas a condiciones sulfato reductoras en el reactor.
- Adaptar el cultivo de BSR con benzoato, fenol y 2-CF en el reactor, como estrategia para que el cultivo adquiriera la capacidad para degradar el 2-CF.
- Determinar la capacidad de consumo desasimilativo de las fuentes de carbono.
- Evaluar el desempeño del reactor al variar la concentración del tóxico.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 ENRIQUECIMIENTO DEL CULTIVO DE BACTERIAS DE CONDICIONES METANOGÉNICAS A CONDICIONES SULFATO REDUCTORAS

6.1.1 INÓCULO

Fue colectado un lodo metanogénico (41.2 g SSV/L) de un reactor UASB que trata las aguas residuales producidas en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Posteriormente se lavó con solución salina al 0.9% para retirar restos de grasas y materia sólida suspendida y eliminar productos metabólicos de dichos microorganismos. Con este lodo se inoculó un reactor UASB de 1.5 L, adicionándole una proporción de la tercera parte de capacidad del reactor (0.5L), que representó un total de 13.73 gSSV/L.

6.1.2 REACTOR UASB

Para la aclimatación del lodo se instaló un reactor UASB, la tubería del sistema fue: manguera de teflón y vidrio, para evitar que el sistema absorbiera los compuestos de estudio. Se colocó en la parte superior del reactor una trampa para gas y un dispositivo para la obtención de muestras. Se utilizó una bomba con capacidad de 1-100 rpm (Cole-Parmer, 7553-80) con cabezal (Masterflex 7518-10) y recipientes para contener el influente y efluente. El reactor se colocó en un cuarto con temperatura controlada a 37°C.

6.1.2.1 CONDICIONES DE ARRANQUE DEL REACTOR UASB

El reactor inicialmente (1-50 días) se operó a un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 1 día, la carga orgánica volumétrica (Bv) fue de 0.5 g_{DQO}/L_{reactor}*día, el gasto (G) fue de 1.03 mL/min, la relación g_{DQO}/g_{SO₄} fue de 0.7. La Bv experimental para las especies carbonadas fue de 0.49 g_{DQO}/L*d correspondiente a la mezcla de benzoato (10%), fenol (75%) y 2-CF (15%) y para el sulfato fue de 0.714 g/L*d. Las condiciones de operación se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de arranque del reactor UASB durante los primeros 50 días.

| Concentración DQO (g/L) | Relación $\frac{DQO}{SO_4}$ | TRH (d) | G (mL/min) | Bv DQO (g/L*d) | Bv SO ₄ (g/L*d) | Fuente de Carbono (%) | Fuente de Azufre |
|-------------------------|-----------------------------|---------|------------|----------------|----------------------------|------------------------------------------|------------------|
| 0.5 | 0.7 | 1 | 1.03 | 0.49 | 0.71 | (10) Benzoato (75) Fenol (15) 2-CF | SO ₄ |

6.1.2.2 ADAPTACIÓN DEL CULTIVO DE BSR CON BENZOATO, FENOL Y 2-CF

Las condiciones de operación del reactor se modificaron en tres ocasiones y consistieron en cambiar las proporciones de la mezcla benzoato-fenol-2-CF, la concentración de sulfato y el TRH. Se utilizó esta mezcla teniendo como base la ruta de biotransformación del 2-CF, que involucra la deshalogenación del cloro produciéndose fenol y a su vez el fenol se carboxila y se transforma en benzoato, finalmente el benzoato sigue la ruta de la Benzoil CoA hasta acetato (Becker y col., 1999).

Durante el transcurso de la operación del reactor y la aclimatación del lodo se variaron las proporciones de esta mezcla, para favorecer la sulfato reducción y promover la degradación del tóxico.

Después del arranque, el día 51 se cambió el TRH a 2 días pero se mantuvieron las proporciones de los compuestos de la mezcla. A partir del día 56 y hasta el día 86 se cambiaron las proporciones de la mezcla, las cuales fueron para el benzoato 75%, fenol 15% y 2-CF 10% y el TRH de 2 días permaneció. La tercera condición consistió en operar el reactor a 2 días de TRH, benzoato 30%, fenol 52.6% y 2-CF 17.4% y la relación g_{DQO}/g_{SO_4} se modificó de 0.7 a 0.6, las condiciones se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de operación durante la aclimatación del reactor UASB.

| Concentración (g/L) | Relación $\frac{DQO}{SO_4}$ | TRH (d) | G (mL/min) | Bv g/L·d | Bv SO_4 g/L·d | Fuente de carbono | | | Fuente de Azufre |
|------------------------|--------------------------------|------------|---------------|-------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | | | | | 1ª Condición (%) | 2ª Condición (%) | 3ª Condición (%) | |
| 0.5 | 0.7 y 0.6 | 1 y | 1.03 y | 0.49 | 0.71 | (10) Benzoato | (75) Benzoato | (30) Benzoato | SO_4 |
| | | 0.5 | 0.5 | (75) Fenol | (15) Fenol | (52) Fenol | | | |
| | | | | (15) 2-CF | (10) 2-CF | (17) 2-CF | | | |

La concentración de la mezcla en DQO fue de 0.5 g_{DQO}/L por lo que se calcularon los $g_{DQO}/g_{compuesto}$ quedando las proporciones siguientes, para el benzoato fue de 1.91, para el fenol 2.38 y para el 2-CF 2.38.

Durante la primer condición que abarcó a partir del arranque y hasta el día 55 la proporción en la mezcla de benzoato fue de 0.05 g/L (26 mgDQO /L), la del fenol fue de 0.375 g/L (157.5 mg DQO/L) y del 2-CF fue de 0.075 g/L (43 mgDQO /L). En la segunda condición que fue a partir del día 56 y hasta el día 86, se cambió la proporción de la mezcla y entonces la proporción del benzoato fue de 0.375 g/L (196 mg DQO/L), del fenol fue 0.075 g/L (31.5 mg DQO /L) y la

proporción de 2-CF fue de 0.05 g/L (28.7 mg DQO/L). En la tercera etapa que comprendió desde el día 87 hasta el día 109 las proporciones manejadas para la mezcla fueron: para el benzoato 0.150 g/L (78.5 mg DQO/L), para el fenol fue de 0.263 g/L (110.5 mgDQO/L) y para el 2-CF fue de 0.087 g/L (50 mgDQO/L).

Durante el arranque y hasta el día 86 la concentración teórica de sulfato fue de 714 mg/L, esto equivale a una proporción de 0.5 gDQO de la fuente de carbono y 0.7 gSO₄ de la fuente de azufre en la relación g_{DQO}/gSO₄, para posteriormente a partir del día 87 y hasta el día 109 cambiar esta relación a 833 mg/L equivalente a 0.5 gDQO de la fuente de carbono y 0.6 gSO₄ de la fuente de azufre.

6.1.3 MEDIO DE CULTIVO

El lodo del reactor fue alimentado con el medio de cultivo Visser (1995), que se describe en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición del medio de cultivo Visser.

| COMPONENTE | CONCENTRACIÓN (g/L) |
|----------------------------------|----------------------|
| NaH ₂ PO ₄ | 0.703 |
| NH ₄ Cl | 0.028 |
| MgSO ₄ | 0.111 |
| CaCl ₂ | 0.100 |
| NaCl | 0.297 |
| KCl | 0.500 |
| Benzoato | 26, 196 y 78.5* |
| Fenol | 157.5, 31.5 y 110.5* |
| 2 CF | 43, 28.7 y 50* |
| SO ₄ | 714 y 833** |

* Valores de concentración de la fuente de carbono las distintas condiciones.

** Valores de concentración del sulfato.

A esta formulación además se le adicionó 1 mL de solución de oligoelementos traza por cada litro de medio mineral y 18 mg/L de extracto de levadura.

La composición de la solución de oligoelementos traza se muestra en la Tabla 5. A esta solución se le agregaron 0.05 mL HCl concentrado por cada litro de solución de oligoelementos traza.

Tabla 5. Solución de oligoelementos traza.

| ELEMENTO | CONCENTRACION (g/L) |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------|
| FeCl ₂ • 4H ₂ O | 2.000 |
| MnCl ₂ • 4H ₂ O | 0.786 |
| Na ₂ SeO ₃ | 0.100 |
| H ₃ BO ₃ | 0.050 |
| ZnCl ₂ | 0.050 |
| (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ | 0.050 |
| AlCl ₃ | 0.050 |
| NiCl ₂ • 6H ₂ O | 0.050 |
| CoCl ₂ • 6H ₂ O | 0.070 |
| CuCl ₂ • 2H ₂ O | 0.050 |

6.1.4 TOMA DE MUESTRAS

Diariamente se tomaron muestras directamente del medio de alimentación y del efluente para la determinación de sulfato, compuestos de la mezcla y acetato. Las muestras fueron tomadas con una jeringa, posteriormente un dispositivo se adaptó en el espacio superior del reactor para la toma de esas muestras para evitar la formación de azufre elemental en las paredes de la manguera del efluente interfiriera con las mediciones. El volumen colectado para el análisis por cromatografía de líquidos (HPLC) y gases (CG) fue de 1.5 mL, se vertieron en tubos Eppendorf, y posteriormente fueron congelados, para su posterior análisis por HPLC o CG. Las muestras para la cuantificación de sulfato fueron procesadas inmediatamente.

6.1.5. TÉCNICAS ANALÍTICAS

6.1.5.1 Compuestos azufrados

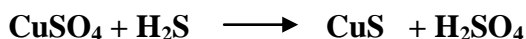
6.1.5.1.1 Sulfato

Se determinó por la técnica descrita por Kolmert y col., (2000), donde la muestra fue tratada con cloruro de bario (J.T. Baker 0970-01), en un medio ácido, con lo cual se forma un precipitado blanco de sulfato de bario, se requirió de un solvente acondicionador, que contuvo glicerina y alcohol, para modificar la viscosidad de la muestra y así permitir que el precipitado de sulfato de bario se mantuviera en suspensión produciendo valores de turbidez estables. La turbidez de este precipitado se midió en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nanómetros y con una celda de 1 cm, los intervalos de concentración de la curva estándar fueron entre 0 y 100 mg/L. Cabe mencionar que las muestras del

reactor fueron diluidas para que la concentración estuviera en el intervalo de predicción de la curva estándar.

6.1.5.1.2 Sulfuro

Se determinó por la técnica descrita por Cord-Ruwisch (1985). Las muestras fueron tratadas con una solución de CuSO_4 (5 mM), la turbidez provocada por la precipitación del CuS , se midió en un espectrofotómetro a 480 nm. La reacción que se llevó a cabo es la siguiente:



Para la elaboración de la curva estándar de sulfuro se realizaron soluciones de 1 a 20 mM.

6.1.5.2 COMPUESTOS CARBONADOS

6.1.5.2.1 Benzoato, Fenol y 2-CF

Los compuestos se determinaron por HPLC utilizando un equipo Thermostepparation con un detector UV, los compuestos fueron detectados a una absorbancia de 280 nm. Se empleó una columna fase reversa Econosphere C18 (5 μ tamaño de partícula, 4.6 mm x 250 mm) con precolumna, para determinar las concentraciones de benzoato, fenol y 2-CF. La fase móvil fue acetonitrilo/buffer de acetatos 5 mM, a pH de 4.5 y a una proporción 50:50. El flujo para la separación fue de 1.2 mL/min, la presión registrada del equipo fue alrededor de 1200 PSI. Las muestras fueron filtradas con filtros de nylon con diámetro de poro de 0.45 μ y las muestras se diluyeron hasta 50 mg/L, para no saturar la columna, siempre se trabajó a temperaturas inferiores a los 9 °C. La fase de lavado fue agua desionizada, el flujo fue de 1 mL/min durante 30 minutos. La fase de almacenamiento de la columna fue acetonitrilo/agua (40:60).

6.1.5.2.2 Acetato

El acetato fue cuantificado por CG (Hewlett Packard 5890 series II) con un detector de ionización de flama (FID), equipado con una columna capilar (0.53 mm x 10 m). Las muestras fueron filtradas con membranas de celulosa con poro de 0.45 μ . Se tomaron 950 μ L y se acidificaron con 50 μ L de ácido clorhídrico al 50%. Se corrió una curva de calibración externa de ácido acético hasta una concentración de 300 mg/L.

7. RESULTADOS

7.1. Enriquecimiento del cultivo de bacterias de condiciones metanogénicas a condiciones sulfato reductoras

7.1.1 ESPECIES AZUFRADAS

En la Figura 2 se observa la concentración de sulfato durante los primeros 50 días. El valor teórico de alimentación de sulfato fue de 714 mg/L [500 mgDQO/L], mientras que en el experimental en promedio fue de 765.42 ± 99.94 mg/L [540 ± 70 mgDQO/L] y en el efluente el promedio fue de 670.44 ± 78.04 mg/L [470 ± 50 mgDQO/L], por lo que 95.02 ± 103 mg/L de sulfato se transformaron en sulfuro, esto equivale a 1 mmol/L. El valor de la eficiencia de consumo de sulfato fue del 12.4% y debido a que no fue significativo se aumentó el TRH de 1 a 2 días, para favorecer el proceso sulfato respiratorio, manteniéndose las concentraciones de los compuestos de la mezcla. Los resultados entre los días 50 y 55 de operación del reactor indicaron que el incremento del TRH no favorece el proceso sulfato respiratorio, dado que la concentración promedio de sulfato en el influente fue de 713.8 ± 19.7 mg/L y en el efluente fue de 629.6 ± 38.1 mg/L, esto representó una eficiencia de consumo del 11.8%, similar a la condición anterior. Por lo que se procedió a cambiar las concentraciones de la mezcla.

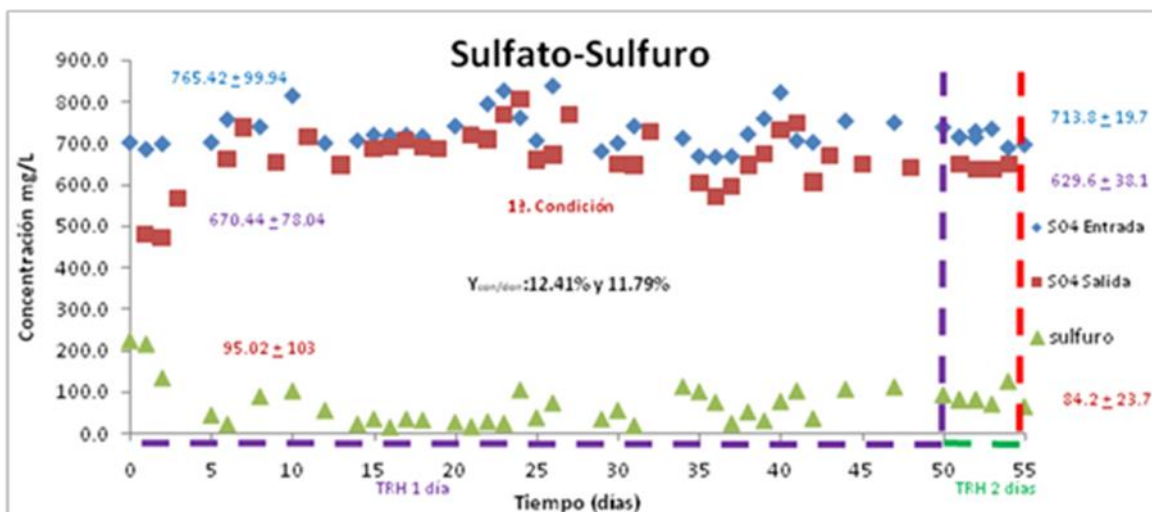


Figura 2. Comportamiento del reactor durante la alimentación con 714 mg/L de sulfato y una relación (DQO=500 mg/L) y $gDQO/gSO_4=0.7$. La producción de sulfuro aquí representada corresponde al valor teóricamente calculado a partir del consumo de sulfato.

7.1.2 ESPECIES CARBONADAS

7.1.2.1 BENZOATO

En la Figura 3 puede observarse la gráfica del consumo total de benzoato durante los primeros 50 días de operación del reactor, el valor teórico para la alimentación en esta etapa fue de 26 mg/L y el experimental de 21 ± 2 mg/L. En el efluente no se detectó este compuesto, por lo que el rendimiento de consumo fue del 100%. Todo el benzoato que ingresó al sistema fue **consumido** por las bacterias, alrededor de 0.178 mmol/L, favoreciendo la actividad sulfato respiratoria en un 12%. Esto indica que el benzoato es importante en el proceso de la sulfato respiración y que su ruta de mineralización es activa y muy eficiente para los microorganismos del consorcio de BSR en este caso.

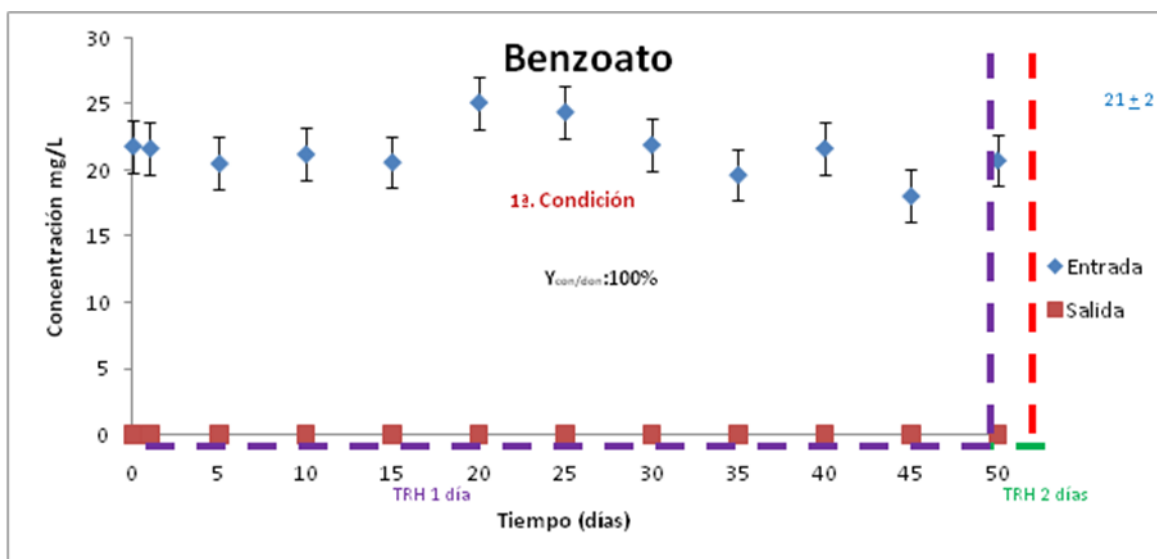


Figura 3. Consumo de benzoato. Proporción de este compuesto en la mezcla: 10% (DQO=500 mg/L).

7.1.2.2 FENOL

La concentración experimental promedio del fenol en el influente y en el efluente se encontró disminuida en un 15% respecto del valor teórico (157.5 mg/L). En el influente se cuantificó una concentración de 140 ± 7 mg/L y en el efluente 122 ± 11 mg/L. Siendo el consumo de fenol de 18 mg/L (0.19 mmoles/L), que equivale a una eficiencia de consumo del 12.8% como se observa en la Figura 4.

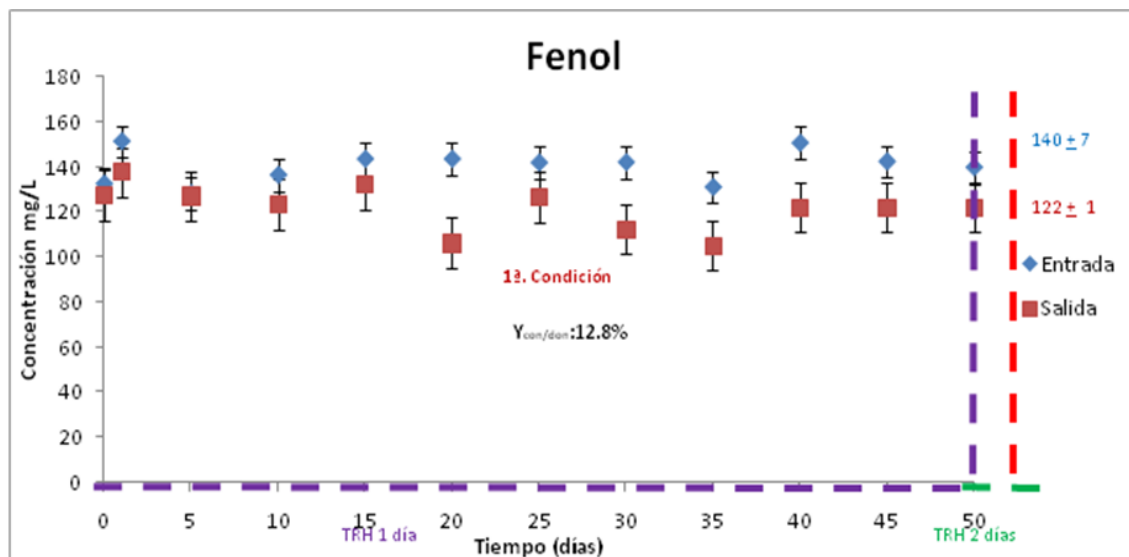


Figura 4. Consumo de fenol al alimentarse en una proporción del 75% (DQO=375 mg/L)

7.1.2.3 2-CF

Durante esta etapa no hubo consumo de 2-CF, esto se muestra en la Figura 5. La concentración cuantificada en el influente fue de 20 ± 3 mg/L y en el efluente de 16 ± 1 mg/L, observándose que la concentración del tóxico a partir de las muestras analizadas tanto del influente como del efluente, mostraron una disminución de la concentración en un 50% para ambas series de muestras. Pero con estos datos se pudo determinar el comportamiento de este compuesto en el reactor.

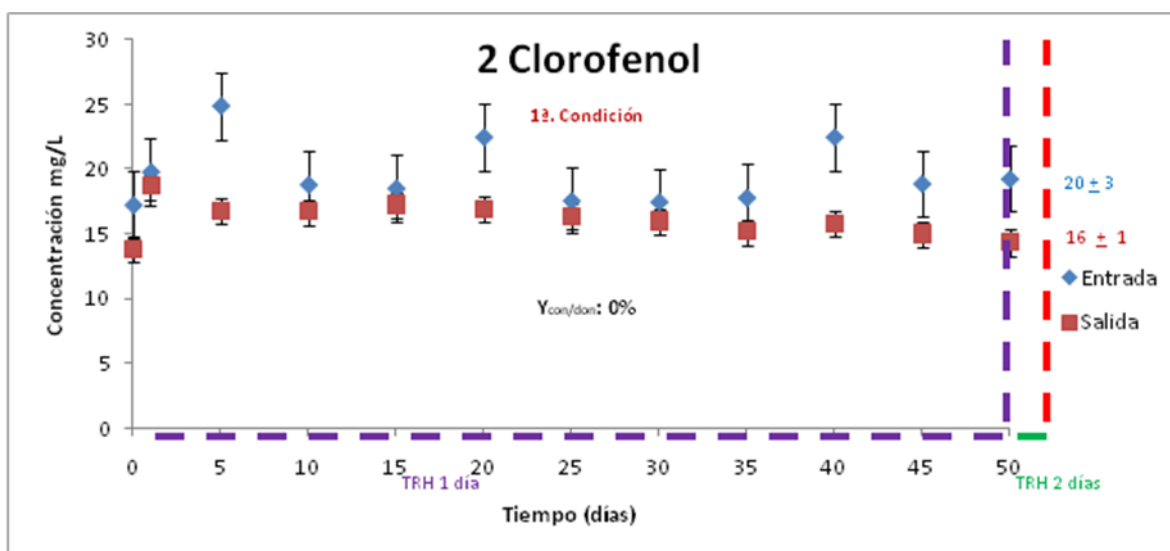


Figura 5. 2-CF en el influente y efluente del reactor, alimentado en una proporción del 15% (DQO=75 mg/L).

7.1.3 BALANCE DE ELECTRONES

Se hizo un balance de electrones para esta etapa, tomando en cuenta que el benzoato fue el compuesto que aportó los electrones para la sulfato reducción. En esta etapa 0.18 mmoles de benzoato fueron consumidos por las bacterias en el proceso sulfato respiratorio lo cual proporcionó los electrones suficientes para que 0.676 mmoles de sulfato se redujeran a sulfuro, aunque en total 1 mmol de sulfato fue consumido durante esta etapa. El sulfato reducido requirió que se consumiera otra de las fuentes carbonadas, probablemente fenol, pero en conjunto el fenol y benzoato teóricamente aportan un excedente de electrones que equivale a que se redujeran 1.3 mmoles de azufre, la diferencia entre la concentración determinada en el consumo de sulfato y el esperado o teórico es de 0.3 mmoles y esto se puede adjudicar al error experimental.

Tabla 6. Balance de electrones, se muestran los mmoles consumidos por compuesto y los mmoles de sulfato que pueden ser reducidos por los electrones donados por cada sustrato.

| PARAMETRO | CONDICIÓN 1 |
|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| BnZ _{Cons} | 0.18 mmol |
| ↓ | |
| SO ₄ _{gen-Bnz} | 0.676 mmol- SO ₄ |
| Fenol _{Cons} | 0.19 mmol |
| ↓ | |
| SO ₄ _{gen-Fenol} | 0.66 mmol-SO ₄ |
| 2-CF _{Cons} | |
| ↓ | |
| SO ₄ _{gen-2-CF} | |
| SO ₄ _{Reducido} | 1 mmol |
| % | 13.5 |
| Reducción de SO₄ Por aporte de e⁻ | 1.3 mmol-SO₄ |
| SO ₄ no determinado | 0.3 mmol |
| % | 23 |

7.1.4. BALANCE DE MASA

En la Tabla 7 se pueden ver los porcentajes de recuperación en mmoles de carbono y azufre para la fuente de carbono consumida en el sistema y el sulfato reducido a sulfuro. El porcentaje de recuperación de carbono en este caso fue para el acetato, no se determinaron otros compuestos intermediarios. Se observa que la tasa de producción de acetato a partir de estos compuestos fue muy baja, con lo cual no se concluye que haya un bajo rendimiento sino que probablemente el carbono restante forma parte de otros compuestos intermediarios.

Tabla 7. Balance de masa para el benzoato, fenol, sulfato y sulfuro, durante la operación del reactor UASB en la primera condición.

| Influente (mmol/L) | Efluente (mmol/L) | | % Recuperación |
|----------------------------------------|----------------------------------------|------------------------|----------------|
| C-Bnz y Fen 2.1 | C-Bnz y Fen 0 | C-acetato 0.0755 | 3.6 |
| S-SO ₄ ⁻² 7.9 | S-SO ₄ ⁻² 6.9 | S-HS ⁻ 1 | 100 |

7.1.5 CONCLUSIONES PARCIALES

De lo anterior se puede concluir que:

- Durante esta etapa existió baja actividad sulfato respiratoria.
- El cambio de TRH de 1 a 2 días no favoreció la sulfato respiración.
- De la mezcla de compuestos carbonados el benzoato fue el que favoreció la sulfato reducción.
- Bajo estas condiciones de operación del reactor no hubo deshalogenación de 2-CF.

7.2 SEGUNDA CONDICIÓN

El objetivo en esta etapa, fue favorecer el proceso sulfato respiratorio, incrementando la concentración de benzoato y disminuyendo las concentraciones de fenol y 2-CF.

7.2.1 ESPECIES AZUFRADAS

Durante la segunda condición que comprendió del día 55 hasta el 86, se observó marcadamente que la sulfato reducción fue favorecida, ver Figura 6, esto ocurrió por la modificación en las proporciones de las fuentes de carbono, en la que se aumentó la concentración de benzoato y se disminuyeron los otros dos compuestos de la mezcla, mientras que la concentración de sulfato permaneció sin cambios. Durante la activación del proceso sulfato respiratorio, el benzoato fue el compuesto que se consumió favorablemente y sirvió como donador de electrones para que los microorganismos sulfato reductores siguieran realizando este proceso con una mayor y mejor eficiencia. En esta condición las concentraciones del sulfato del influente y del efluente, fueron de 768.7 ± 62.9 y 347.0 ± 114.8 (mg/L) respectivamente, de aquí se determinó que 421.7 mg/L sulfato fueron reducidos a sulfuro (4.38 mmol/L), que equivalen a una eficiencia de consumo del 54.8%.

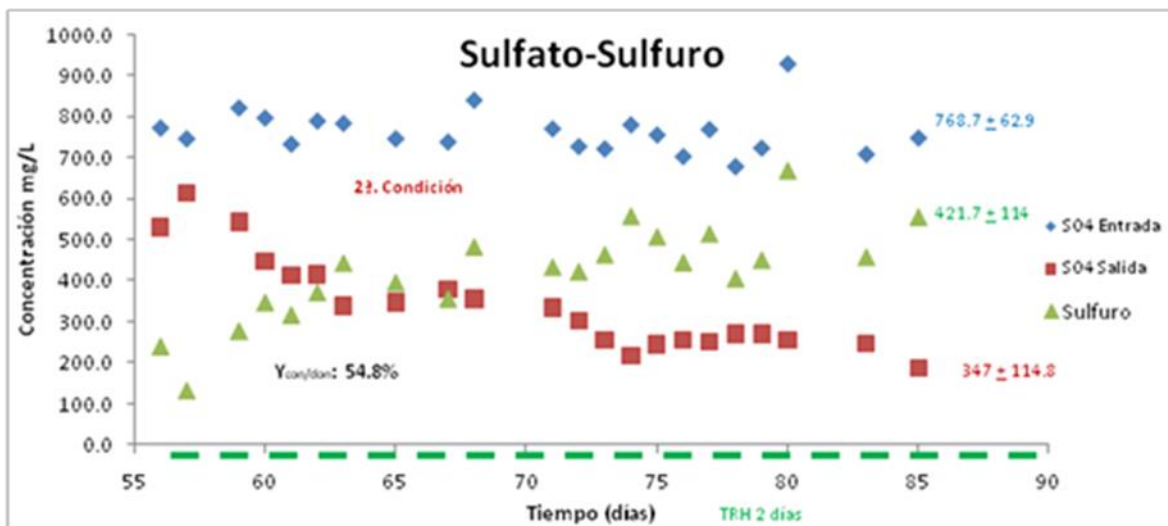


Figura 6. Comportamiento del sulfato y sulfuro, durante la alimentación de benzoato en una proporción del 75%. La producción de sulfuro aquí representada corresponde al valor teóricamente calculado a partir del consumo de sulfato.

7.2.2 ESPECIES CARBONADAS

7.2.2.1 BENZOATO

En la Figura 7 se presenta el consumo del benzoato, observándose que el comportamiento de consumo se repite como en la condición anterior, pero con la diferencia de que aquí la concentración de benzoato se aumentó en la proporción en la mezcla (75%). La concentración detectada en el influente fue de 173 ± 15 mg/L, valor en promedio disminuido del teórico esperado (11.73%). No obstante la eficiencia de consumo en esta etapa fue del 100%.

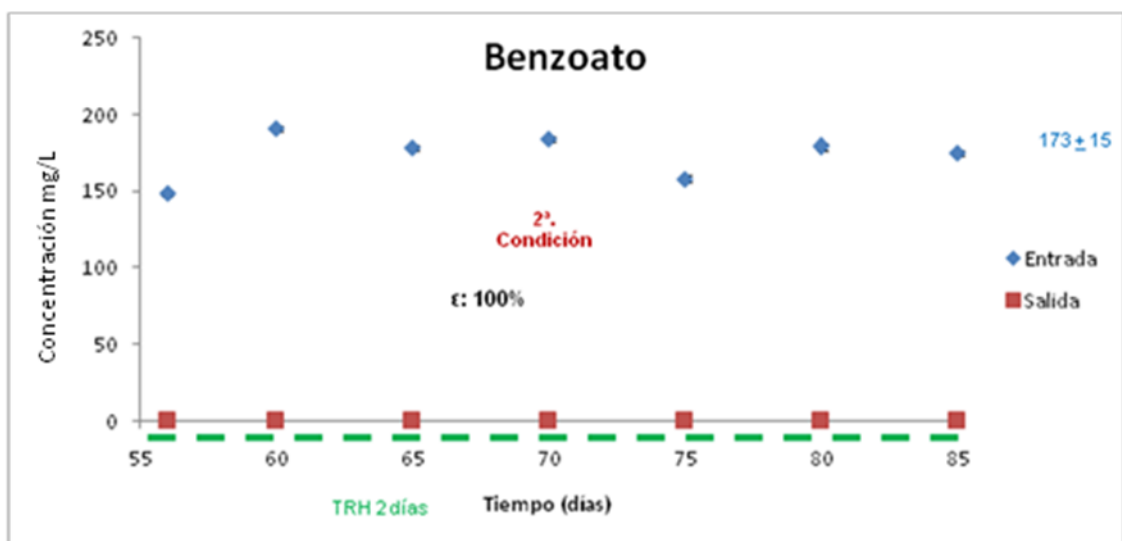


Figura 7. Consumo de benzoato, al alimentarse en una proporción del 75%.

7.2.2.2 FENOL

En la figura 8, se observa que durante esta condición incrementó ligeramente el consumo de fenol, alcanzando una eficiencia promedio del 26%. La concentración determinada de fenol en el influente fue de 27 ± 2 mg/L y en el efluente de 20 ± 3 mg/L. Estos resultados indican que en estas condiciones tanto la sulfato reducción como la degradación del anillo aromático fueron favorecidos. Posiblemente el fenol sufrió una carboxilación transformándose en benzoato, que pudo seguir la ruta de degradación de los compuestos aromáticos no halogenados propuesto por Becker y col. (1999). Esta formación de benzoato no se pudo confirmar, debido a que todo el benzoato generado en el sistema fue consumido inmediatamente.

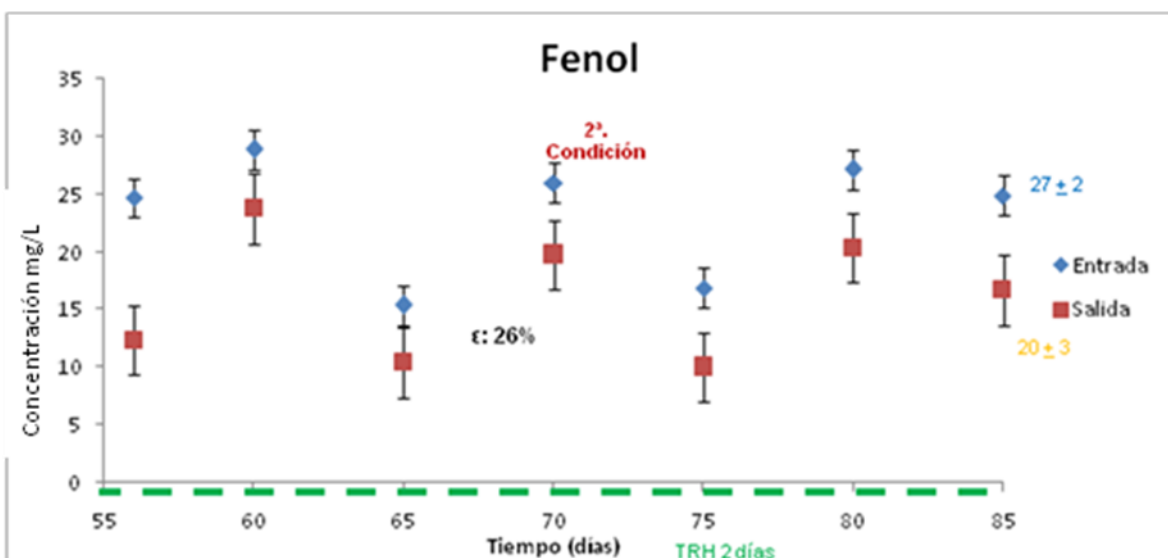


Figura 8. Fenol en el influente y el efluente del reactor cuando fue alimentado en una proporción del 15%.

7.2.2.3 2-CF

Durante esta condición no se detectó la deshalogenación de 2-CF, la concentración del tóxico en el influente fue de 14 ± 2 mg/L y en el efluente de 16 ± 2 mg/L (Figura 9), no encontrándose diferencia significativa entre los valores del influente y del efluente, por lo que se concluye que no hubo degradación o bioacumulación del tóxico en el sistema.

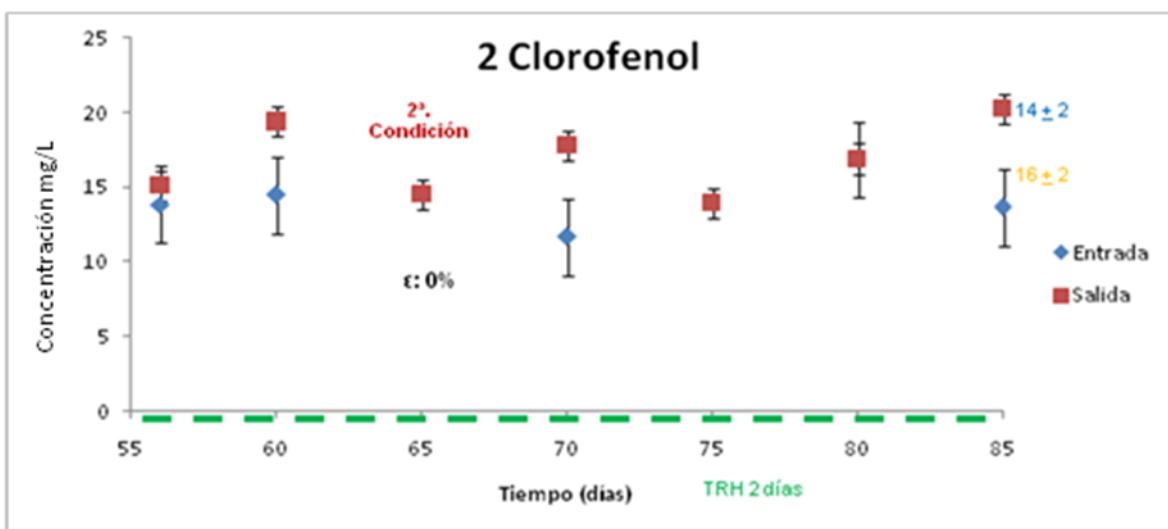


Figura 9. 2-CF en el influente y el efluente, al alimentarse en una proporción del 10% en la mezcla.

7.2.3 BALANCE DE ELECTRONES

Para el balance de electrones se calcularon los mmoles de benzoato y de fenol consumidos, ambos aportaron electrones para que 5.44 mmoles de sulfato fueran reducidos a sulfuro y el consumo de sulfato en esta etapa fue de 4.4 ± 1.2 mmoles (Tabla 8). Existe una diferencia de 1 mmol de sulfato reducido, esta diferencia puede deberse al error experimental en la determinación del sulfato en el efluente por la turbidez generada por la oxidación del sulfuro que aumentó en esta etapa.

Tabla 8. Balance de electrones a partir de benzoato y fenol.

| PARAMETRO | CONDICIÓN 2 |
|--------------------------------------------------------------|----------------------------|
| Bnz _{Cons} | 1.4 mmol |
| ↓ | |
| SO ₄ ^{gen-Bnz} | 5.2 mmol- SO ₄ |
| <hr/> | |
| Fenol _{Cons} | 0.07 mmol |
| ↓ | |
| SO ₄ ^{gen-Fenol} | 0.24 mmol- SO ₄ |
| <hr/> | |
| 2-CF _{Cons} | 0 mmol |
| ↓ | |
| SO ₄ ^{gen-2 CF} | 0 mmol- SO ₄ |
| <hr/> | |
| SO ₄ ^{Reducido} | 4.4 mmol |
| % | 59.5 |
| <hr/> | |
| Reducción de SO ₄ por aporte de e ⁻ | 5.44 mmol-SO ₄ |
| <hr/> | |
| SO ₄ no determinado | 1 mmol |
| % | 22.7 |

7.2.4 BALANCE DE MASA

En la Tabla 9 se pueden ver los porcentajes de recuperación en mmoles de carbono y azufre para la fuente de carbono consumida en el sistema y el sulfato reducido a sulfuro. El porcentaje de recuperación de carbono en este caso fue para el acetato. Por los resultados puede observarse que la producción de acetato a partir de estos compuestos fue muy baja, con lo cual no se puede concluir que haya habido bajo rendimiento sino que probablemente el carbono restante se encuentra o forma parte de otros compuestos que son intermediarios en la ruta de mineralización del benzoato.

Tabla 9. Balance de masa para el benzoato, fenol, sulfato y sulfuro, durante la operación del reactor UASB.

| Influente (mmol/L) | Efluente (mmol/L) | | |
|---------------------------------|---------------------------------|-------------------|----------------|
| C-Bnz y fenol | C-Bnz y fenol | C-acetato | % Recuperación |
| 10.1 | 1.284 | 0.215 | 15 |
| <hr/> | | | |
| S-SO ₄ ⁻² | S-SO ₄ ⁻² | S-HS ⁻ | % Recuperación |
| 8 | 3.6 | | 100 |

7.2.5 CONCLUSIONES PARCIALES

- El aumento en la concentración del benzoato favoreció la sulfato reducción.
- Con las proporciones de compuestos carbonados probadas se alcanzó un consumo de fenol del 26%
- Las proporciones ensayadas no promovieron la deshalogenación del 2-CF.

7.3 TERCERA CONDICIÓN

Para la tercera condición se modificó la relación DQO/SO₄ a 0.6 y las proporciones de concentración de los compuestos carbonados. Con la finalidad de favorecer la deshalogenación del 2-CF.

7.3.1 COMPUESTOS AZUFRADOS

Para esta condición la concentración teórica de sulfato fue igual a 833 mg/L y la concentración experimental en el influente fue de 1002.0 ± 65.1 mg/L, en el efluente se registró una concentración de 640.1 ± 54.9 mg/L, con lo que 361.1 mg/L de sulfato se redujeron a sulfuro. El consumo de sulfato fue de 361.1 ± 81.7 mg/L, la eficiencia de consumo calculada fue del 36.2% (figura 10). En esta etapa la sulfato reducción disminuyó, demostrando que este proceso depende de la concentración de benzoato, pero como se muestra posteriormente en esta etapa el fenol aportó una cantidad considerable de electrones para el proceso sulfato respiratorio.

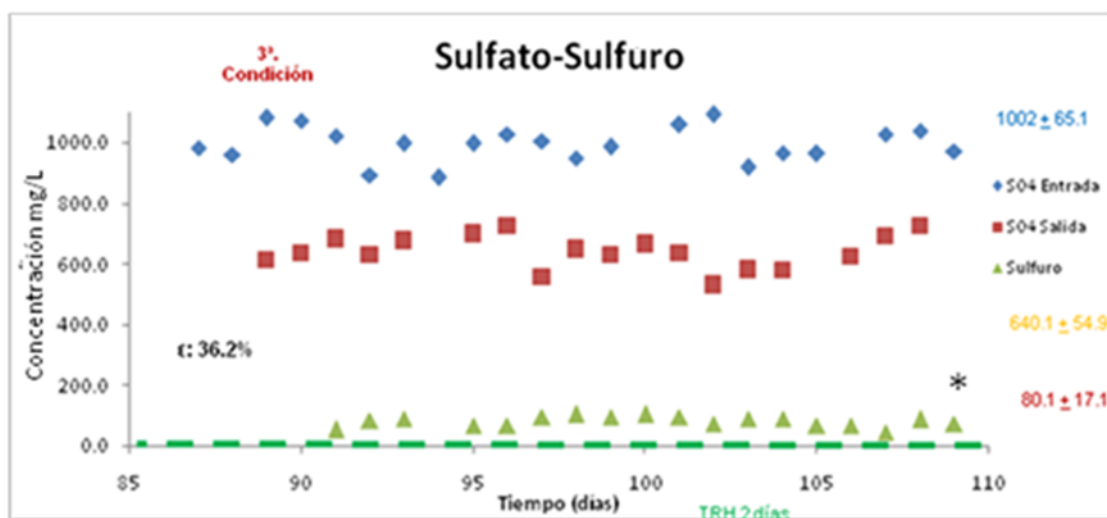


Figura 10. Perfil de consumo de sulfato y producción de sulfuro a una relación DQO/SO₄ de 0.6.

La concentración de sulfuro fue de 2.4 ± 0.5 mmoles/L, mientras que el valor teórico fue de 3.7 ± 0.6 mmoles/L.

7.3.2 ESPECIES CARBONADAS

7.3.2.1 BENZOATO

Durante esta condición el benzoato se consumió totalmente (Figura 11), la concentración del benzoato en el influente fue de 92.3 ± 12 mg/L, siendo mayor a la teórica esperada (78.53 mg/L).

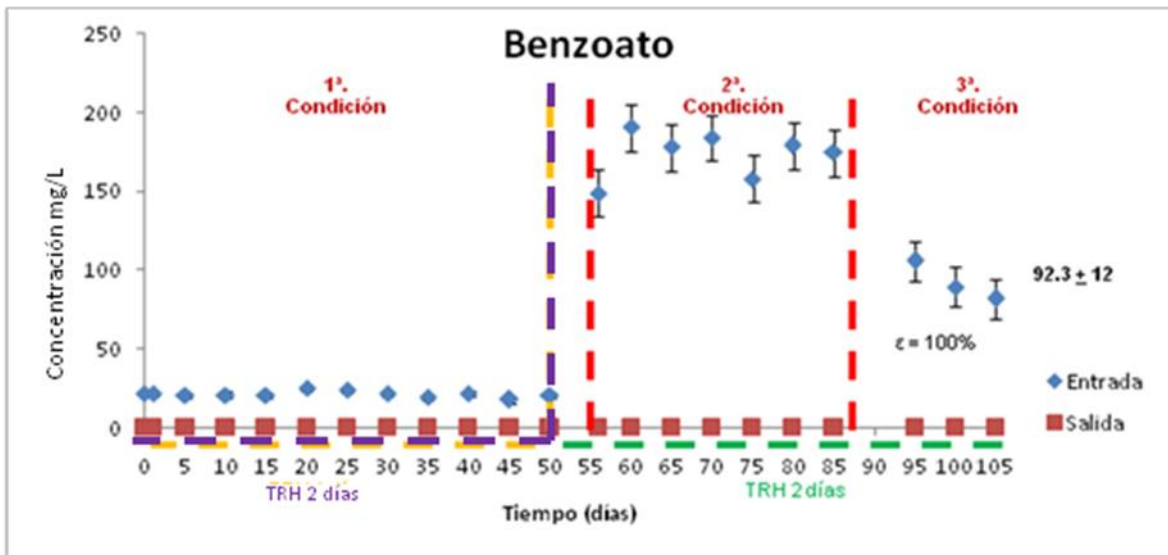


Figura 11. Benzoato en el influente y efluente, la proporción alimentada en la mezcla fue del 30%.

7.3.2.2 FENOL

Fue en esta etapa donde se encontró un mayor consumo de fenol (57 mg/L), alcanzando una eficiencia del 59.37%. Como puede observarse en la Figura 12, el fenol junto con el benzoato favoreció el proceso sulfato respiratorio. Además no se observó acumulación de benzoato como producto de la degradación de fenol ya que el benzoato fue fácilmente consumido por las bacterias sulfato reductoras.

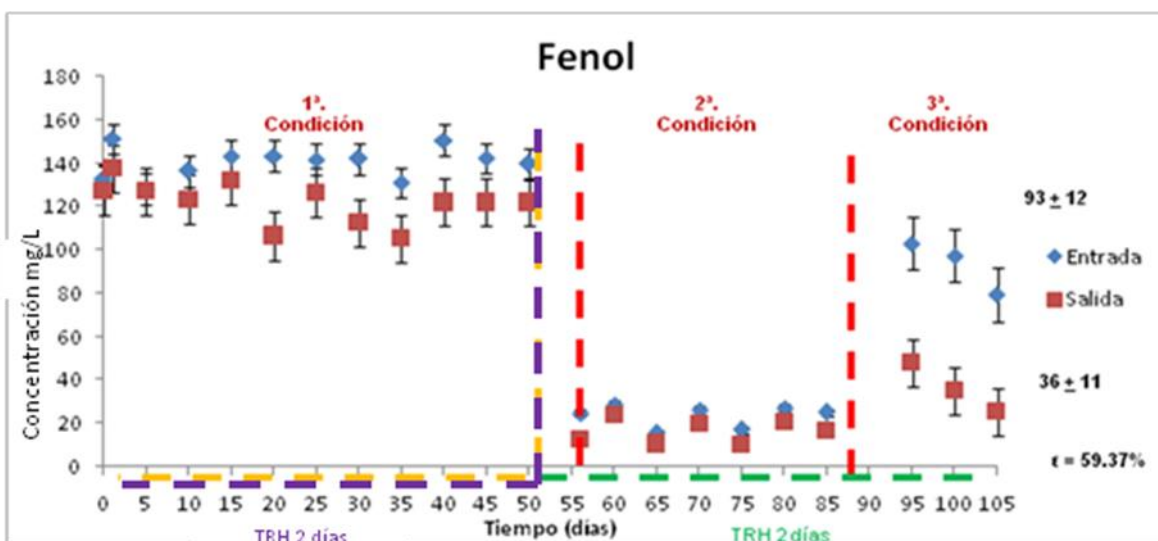


Figura 12. Fenol en el influente y efluente cuando se alimentó en la mezcla en una proporción del 52.6%.

7.3.2.3 2-CF

En esta condición y durante el tiempo que se operó el reactor, no se observó una disminución significativa en la concentración del 2-CF, por lo que se descarta que haya ocurrido la deshalogenación reductiva de este compuesto (ver Figura 13). Al respecto, Boyd y Shelton (1984), mencionan que el producto más directo de la deshalogenación reductiva es el fenol y coinciden con lo que posteriormente mencionan Chang y col. (2004). En este estudio las BSR no presentaron esta capacidad, aun en presencia de compuestos carbonados que serían intermediarios de la degradación del 2-CF. Mohn y Tiedje (1992), mencionan que durante el periodo de aclimatación, la deshalogenación reductiva no es detectable ya que esta en muestras extraídas de ambientes naturales toman períodos largos, incluso meses, no obstante, después de este período los compuestos son deshalogenados rápidamente. En este estudio se corroboró la característica recalcitrante del 2-CF durante los 105 días de experimentación.

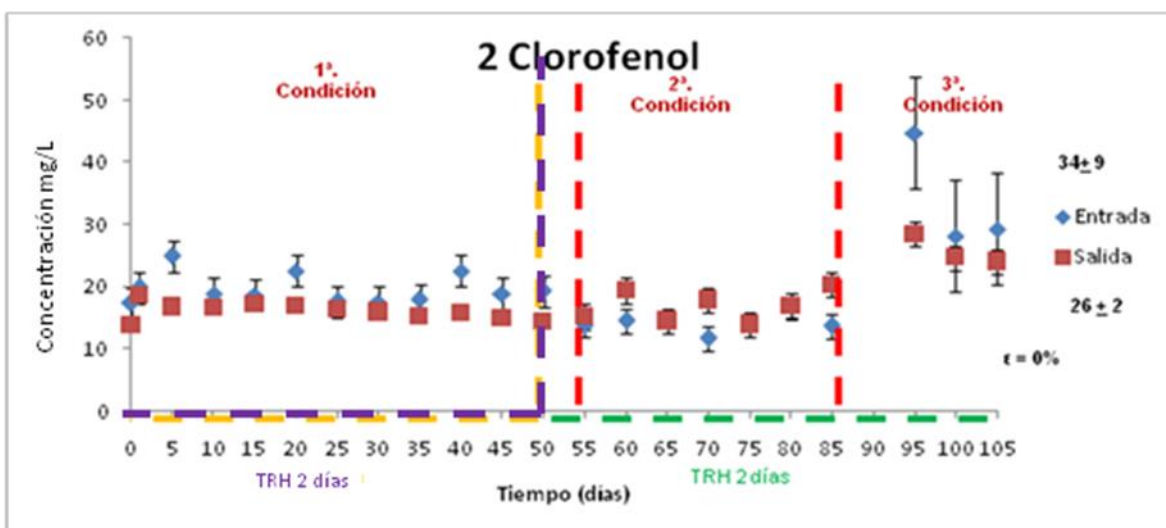


Figura 13. 2-CF en el influente y el efluente, durante la alimentación en una proporción en la mezcla de 1 7.4%.

7.3.3 BALANCE DE ELECTRONES

En esta etapa el fenol y el benzoato aportaron los electrones para que el proceso sulfato respiratorio siguiera activo, en conjunto aportaron los electrones suficientes para que 5.1 mmoles de sulfato fueran convertidos a sulfuro. Se determinó que en esta etapa 3.7 mmoles/L de sulfato fueron reducidos a sulfuro, comparando ambos datos hubo una diferencia de 1.4 mmol/L de sulfato consumidos, quizá fue debido a la presencia de turbidez en las muestras ver la Tabla 10.

Tabla 10. Balance de electrones realizado a partir de benzoato y fenol.

| PARÁMETRO | CONDICIÓN 3 |
|----------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| Bnz _{Cons} | 0.8 mmol |
| ↓ | |
| SO ₄ ^{gen-Bnz} | 3 mmol- SO ₄ |
| Fenol _{Cons} | 0.61 mmol |
| ↓ | |
| SO ₄ ^{gen-Fenol} | 2.1 mmol- SO ₄ |
| 2-CF _{Cons} | 0 mmol |
| ↓ | |
| SO ₄ ^{gen-2 CF} | 0 mmol- SO ₄ |
| SO ₄ ^{Reducido} | 3.7 mmol |
| % | 43 |
| Reducción de SO₄ por aporte de e⁻ | 5.1 mmol-SO₄ |
| SO ₄ no determinado | 1.4 mmol |
| % | 37.8 |

7.3.4 BALANCE DE MASA

En la Tabla 11 se pueden ver los porcentajes de recuperación en mmoles de carbono y azufre para la fuente de carbono consumida en el sistema y el sulfato reducido a sulfuro. El porcentaje de recuperación de carbono sigue siendo bajo para el acetato. Lo que indica que en la mineralización del benzoato no todo se acumula en acetato sino que probablemente una gran parte se quede acumulada en productos intermediarios o en otros productos que van más allá de esta ruta. En esta etapa el porcentaje de recuperación de azufre determinada presentó una pérdida del 12.5% esto se adjudica a la baja sensibilidad de la determinación de sulfuro a concentraciones menores a 5 mmoles por la técnica de Cord-Ruwisch (1985).

Tabla 11. Balance de masa para el benzoato, fenol, sulfato y sulfuro, durante la operación del reactor de UASB.

| Influente (mmol/L) | Efluente (mmol/L) | | |
|-----------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------|------------------------|
| C-Bnz y fenol 8.95 | C-Bnz y fenol 2.3 | C-acetato 0.216 | % Recuperación 28 |
| S-SO ₄ ⁻² 10.4 | S-SO ₄ ⁻² 6.7 | S-HS ⁻ 2.4 | % Recuperación 87.5 |

7.3.5 CONCLUSIONES PARCIALES

- El benzoato continuo siendo el compuesto que favoreció la sulfato respiración.
- El fenol alcanzó una eficiencia de consumo significativo, indicando que dentro del consorcio sulfato reductor se promovió la actividad de bacterias con capacidad de consumir este compuesto y transformarlo en un compuesto más asimilable como el benzoato.
- El 2-CF es un tóxico persistente, por lo que probablemente para lograr su degradación con un lodo sulfato reductor se requiere de más tiempo.

7.3.6 RESUMEN DE RESULTADOS

En esta sección se presentan las tablas con los resultados obtenidos para las especies azufradas y carbonadas durante las tres etapas en la operación del reactor UASB.

Tabla 12. Resumen de los resultados obtenidos durante las tres etapas de operación del reactor para los compuestos azufrados

| Etapa (días) | gDQO/gD _{QO} SO ₄ | Valor teórico de alimentación de SO ₄ mg/L. | SO ₄ . Experimental mg/L | SO ₄ . Efluente mg/L | Sulfuro mg/L | mmol/L | Eficiencia de consumo de sulfato |
|-------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|--------------|------------|----------------------------------|
| 1 ^a (1-50) | = 0.7 | 714 | 765.4 ± 99.9 | 670.4 ± 78.04 | 95.02 | 1 | 12.4% |
| 1 ^a (51-55) | = 0.7 | 714 | 713.8 ± 19.7 | 629.6 ± 38.1 | 84.2 | 0.88 | 11.8%, |
| 2 ^a (56-89) | = 0.7 | 714 | 768.7 ± 62.9 | 347.0 ± 114.8 | 421.7 | 4.38 | 54.8%. |
| 3 ^a (90-105) | = 0.8 | 833 | 1002 ± 65.1 | 640.1 ± 54.9 | 361.1 | 3.76 | 36.2% |
| | | | | | | 2.4 ± 0.5* | |

* Concentración de sulfuro por la técnica de Cord-Ruwisch (1985).

Tabla 13. Resumen de los resultados obtenidos durante las tres etapas de operación del reactor para el benzoato.

| Etapa | Proporción en la mezcla | Valor teórico de alimentación de benzoato mg/L | Benzoato experimental mg/L | Benzoato efluente mg/L | Consumo benzoato mg/L | Benzoato mmol/L | Eficiencia de consumo de benzoato | Eficiencia de consumo de sulfato |
|----------------|-------------------------|------------------------------------------------|----------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| 1 ^a | 10% | 26 | 21 + 2 | 0 | 21 + 2 | 0.178 | 100% | 12% |
| 2 ^a | 75% | 196 | 173 + 15 | 0 | 173 + 15 | 1.43 | 100% | 41.1% |
| 3 ^a | 30% | 78.53 | 92.3 + 12 | 0 | 92.3 + 12 | 0.76 | 100% | 10.9% |

Tabla 14. Resumen de los resultados obtenidos durante las tres etapas de operación del reactor para el fenol.

| Etapa | Proporción en la mezcla | Valor teórico de alimentación de fenol mg/L | Fenol experimental mg/L | Fenol efluente mg/L | Consumo de fenol mg/L | Fenol mmol/L | Eficiencia de consumo de fenol | Eficiencia de consumo de sulfato |
|----------------|-------------------------|---------------------------------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------|--------------|--------------------------------|----------------------------------|
| 1 ^a | 75% | 157.5 | 140 + 7 | 122 + 11 | 18 | 0.19 | 12.8% | * |
| 2 ^a | 15% | 31.5 | 27 + 2 | 20 + 3 | 7 | .074 | 26% | 13.7% |
| 3 ^a | 52.6% | 110.5 | 93 + 12 | 38 + 11 | 57 | 0.59 | 59.37% | 25.3% |

* No significativo

Tabla 15. Resumen de los resultados obtenidos durante las tres etapas de operación del reactor para el 2-CF.

| Etapa | Proporción en la mezcla | Valor teórico de alimentación de 2-CF mg/L | 2-CF experimental mg/L | 2-CF efluente mg/L | Consumo de 2-CF mg/L | 2-CF mmol/L | Eficiencia de consumo de 2-CF | Eficiencia de consumo de sulfato |
|----------------|-------------------------|--------------------------------------------|------------------------|--------------------|----------------------|-------------|-------------------------------|----------------------------------|
| 1 ^a | 15% | 43 | 20 ± 3 | 16 ± 1 | * | * | * | * |
| 2 ^a | 70% | 28.7 | 14 ± 2 | 16 ± 2 | * | * | * | * |
| 3 ^a | 17.4% | 50 | 34 ± 9 | 36 ± 2 | * | * | * | * |

* No significativo.

7.4 pH

El pH del influente se ajustó siempre a 7.11 ± 0.12 , durante el tiempo de operación del reactor, el pH en el efluente fue aproximadamente de 6.98 ± 0.1 como puede observarse en la Figura 14. No se presentó un cambio significativo en los valores del efluente dado que en valores neutros.

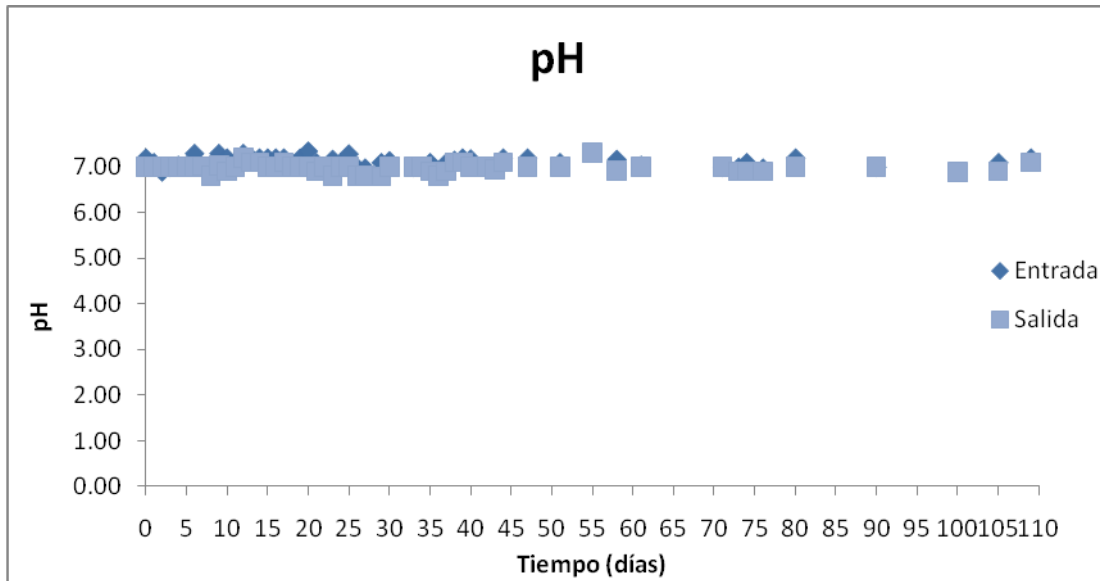


Figura 14. Muestra el comportamiento del pH durante la operación del reactor UASB.

7.5 ACETATO

Los valores de recuperación de acetato en el efluente, fueron muy bajos (cerca del 10%) ver Tabla 16. Una explicación es que la degradación de los compuestos haya tomado otra vía, o que la velocidad con que se metabolizó el acetato fue alto dentro de la ruta de mineralización del benzoato, o en su defecto el acetato producido en el sistema funcionó como otro donador de electrones en el proceso de la sulfato reducción para las BSR organotróficas en este sistema.

En la siguiente Tabla se observan los valores de recuperación del acetato respecto al teórico esperado, estos valores son muy bajos, lo cual indica que el acetato en el medio debió seguir otra ruta de consumo y esta probablemente fue la sulfato reducción. En la segunda condición, cuando incrementa el valor de recuperación del acetato, la fuente de carbono que favorecía la sulfato respiración fue más eficiente, por lo que permitió un incremento de acetato en el sistema.

Tabla 16. Valores teóricos de formación de acetato por molécula de compuesto en las diferentes condiciones de operación del reactor UASB y el porcentaje recuperado.

| Condición | mmol Benzoato _{Teo} | mmol Fenol _{Teo} | mmol 2-CF _{Teo} | mmol Acetato _{Teo} | mmol Acetato _{Rec} | % Recuperado |
|-----------|------------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------|
| 1 | 1.08 | 0 | 0 | 0.54 | 0.151 | 2.8 |
| 2 | 8.4 | 0.416 | 0 | 4.41 | 0.431 | 9.8 |
| 3 | 4.8 | 3.65 | 0 | 4.22 | 0.140 | 3.3 |

En la Figura 15, se aprecia un aumento paulatino en la formación de acetato en la primera y segunda condición, mientras que en la tercera permaneció constante alrededor de 12 y 8 mg/L, respectivamente.

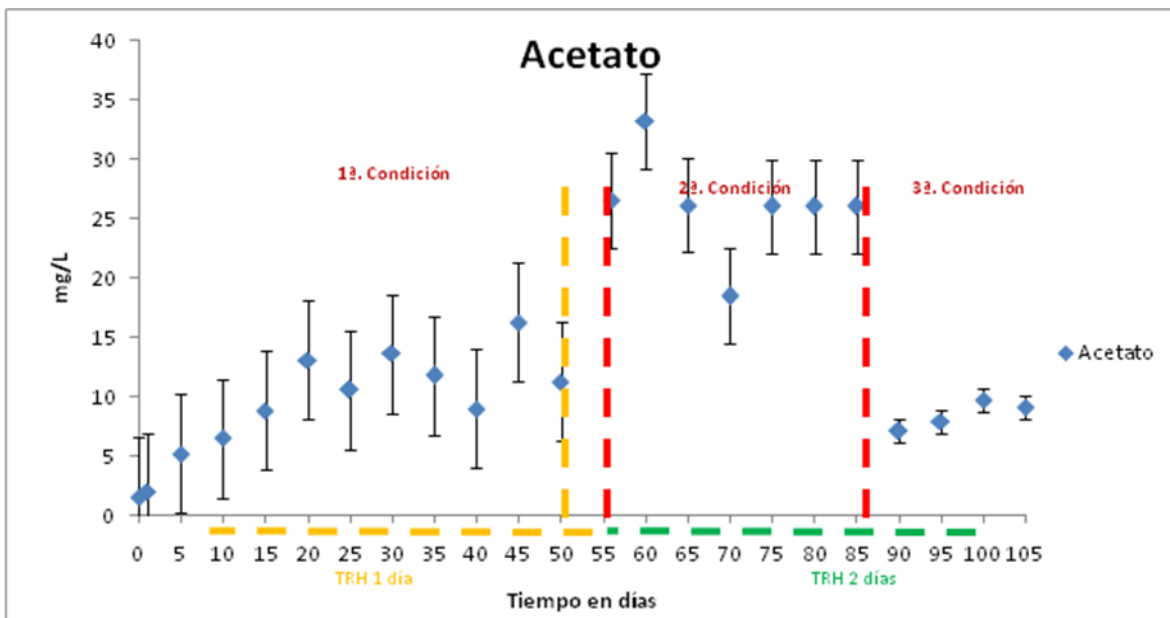


Figura 15. Comportamiento del acetato durante las diferentes condiciones de operación del reactor.

8. CONCLUSIONES GENERALES

El enriquecimiento del cultivo de condiciones metanogénicas a condiciones de sulfato reducción fue alcanzada y activada por el consorcio de BSR por efecto del benzoato, que a su vez indujo la mineralización del fenol, por lo que este último participó como un inductor del proceso sulfato respiratorio. El enriquecimiento con la mezcla de benzoato, fenol y 2-CF no produjo que en un tiempo de 105 días se alcanzara la degradación del 2-CF, reafirmando con esto su característica recalcitrante. El consumo de las fuentes de carbono en este proceso fue mayor para el benzoato, las BSR lo consumieron de inmediato, seguido del fenol (59.37%). La variación del tóxico en el reactor (entre 75 y 15 mg/L) no mejoró la degradación de este compuesto en el sistema. Degradar este tipo de compuesto lleva periodos de tiempo largos.

9. BIBLIOGRAFIA

- Atuanya, E. I. y Chakrabarti, T. (2003). Biotreatability and kinetics of UASB reactor to mixtures of chlorophenols pollutants. *Environmental Monitoring and Assessment*. **83**: 283-294.
- Atuanya, E. I. y Chakrabarti, T. (2004). Kinetics of biotransformation of 2,4-dichlorophenol using UASB-reactor. *Environmental Monitoring and Assessment*. **96**: 129-141.
- Basu, S., Oleszkiewicz, J. y Sparling, R. (1996) Dehalogenation of 2-chlorophenol (2-CP) in anaerobic batch cultures. *Water Research*. **30**(2): 315-322.
- Becker, J. G., Berardesco, G., Rittmann, B. E. y Stahl, D.A. (2005). The role of syntrophic associations in sustaining anaerobic mineralization of chlorinated organic compounds. *Environ Health Perspect* **113**:310–316
- Beeman, R. E., Howell, J. E., Schumaker, S. H., Salazar, E. A. y Buttram, J. R. (1983). A field evaluation of in-situ microbial reductive dehalogenation by the biotransformation of chlorinated ethynes., en *In-Situ and On-Site Bioremediation*. Ed Hinchee R.E., Lewis Publishers , Boca Raton Florida, pp. 14-27.
- Beltrame P., Beltrame., P. L., Carniti, P., Guardione, D. y Lanzetta, C. (1988). Inhibiting action of chlorophenols on biodegradation of phenols and its correlation with structural properties of inhibitors. *Biotechnol. and Bioengin.*, **31**:821-828
- Blum, D. J. W. y Speece, R. E. (1991a). Quantitative structure-activity relationships for chemical toxicity to environmental bacteria. *Ecotox. and Environ. Safety*. **22**:198-224.
- Blum D. J. W. y Speece, R. E. (1991b). A database of chemical toxicity to environmental bacteria and its use in interspecies comparisons and correlations. *Res. J. Water Pollut. Control. Fed.* **63**(3):198-207.
- Boyd, S. A., Shelton, D. R., Berry, D. y Tiedje, J. M. (1983). Anaerobic biodegradation of phenolic compounds in digested. *Appl. Environ. Microb.* **46**(1): 50-54.
- Boyd, S. A. y Shelton, D. R. (1984). Anaerobic biodegradation of chlorophenols in fresh and acclimated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*. **47**(2):272-277.
- Cord-Ruwisch, R. (1985). A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *J. Microbiol. Methods* **4**:33–3.
- De Weerd K. A. y Suflita, J. M. (1991). Anaerobic biotransformations of chemical pollutants in aquifers. *J. Industrial Microb.* **3**:179-194.
- Dolfing, J. y Harrison, B. K. (1992). The Gibbs free energy of formation of halogenated aromatic compounds and their potential role as electron acceptors in anaerobic environments. *Environ. Sci. Technol.* **26**:2213-2218.

- Ehlers, G. A. y Rose, P. D. (2006). The potential for reductive dehalogenation of chlorinated phenol in a sulphidogenic environment in situ enhanced biodegradation. *Water SA*. **32**(2):243-248.
- Ennik-Marsen, K. A., Louwerse, A., Roelofsen, W. y Stams, A. J. M. (1998). Influence of monochlorophenols on methanogenic activity in granular sludge. *Wat. Res.* **32**(10):2977-2982.
- Gibson, S. A. y Suflita, J. M. (1986). Extrapolation of biodegradation results to groundwater aquifers: reductive dehalogenation of aromatic compounds. *Appl. Environ. Microb.* **52**(4):681-688.
- Gibson, S. A. y Suflita, J. M. (1990). Anaerobic biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid in samples from a methanogenic aquifer: stimulation by short-chain organic acids and alcohols. *Appl. Environ. Microb.* **56**:1825-1832.
- Gibson, S. A. y Suflita, J. M. (1993). Role of electron-donating cosubstrates in the anaerobic biotransformation of chlorophenoxyacetates to chlorophenols by a bacterial consortium enriched on phenoxyacetate. *Biodegradation*. **4**:51-57.
- Goldberg, D. E. (1995). Emerging problems in the coastal zone for the twenty-first century. *Mar. Pollut. Bull.* **31**:152-158.
- Hägglom, M. y Young, L. (1990). Chlorophenol degradation coupled to sulfate reduction. *Appl. Environ. Microb.* **56** (11):3255-3260.
- Hägglom, M. y Young, L. (1995). Anaerobic degradation of halogenated phenols by sulfate reducing consortia. *Appl. Environ. Microb.* **61**(4): 1546-1550.
- Kuhn, E. P., Townsend, G. T. y Suflita J. M. (1990). Effect of sulfate and organic carbon supplements on reductive dehalogenation of chloroanilines in anaerobic aquifer slurries. *Appl. Environ. Microbiol.* **56** (9):2630-2637.
- King, G. M. (1988). Dehalogenation in marine sediments containing natural source of chlorophenols. *Appl. Environ. Microb.* **54**: 3079-3085.
- Kohring, G. W., Zhang, X. y Wiegel, J. (1989). Anaerobic dechlorination of 2,4-dichlorophenol in freshwater sediments in the presence of sulfate. *Appl. Environ. Microbiol.* **55** (10):2735-2737.
- Kollmert, A. H. (2000). Colorimetric determination of sulfate by Barium Chloride. *Anal Chem.* **27**:479:484.
- Liu, D. y Pacepavicius, G. (1990). A systematic study of the aerobic and anaerobic biodegradation of 18 chlorophenols and 3 cresols. *Toxicity Assessment*: **5**:367-387.
- Sarathi-Majumder y Gupta, S. (2007). Removal of chlorophenols in sequential anaerobic-aerobic reactors. *Bioresource Technology*, **98**:118-129.
- Milligan, P. W. y Hägglom, M. H. (2001). Anaerobic degradation and dehalogenation of chlorosalicylates and salicylate under four reducing conditions. *Biodegradation*. **12**:159-167.

- Mohn, W. y Tiedje, J. M. (1992). Microbial reductive dehalogenation. *Microbiol Mol Biol. Rev.* **56**(3):482-507.
- Sun, B., Cole, J., Sanford, R. y Tiedje, J. (2000). Isolation and characterization of *Desulfovibrio dechloracetivorans* sp. nov., a marine dechlorating bacterium growing by coupling the oxidation of acetate to the reductive dechlorination of 2-chlorophenol. *Appl. Environ. Microb.* **66**(6):2408-2413.
- Torres-Alvarado R. y Calva B. L. (2002). Compuestos fenólicos: origen, distribución y efectos en los ecosistemas marinos. *Contactos.* **44**:31-43.
- Townsend, G. T., Ramanand, K. y Suflita, J. M. (1997). Reductive dehalogenation and mineralization of 3-chlorobenzoate in the presence of sulfate by microorganisms from a methanogenic aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(7):2785-2791.
- Visser, A. (1995). The Anaerobic Treatment of Sulphate Containing Wastewater. Ph D Thesis Agricultural. Wageningen Agricultural University. The Netherlands.
- Widdel, F. (1988). Microbiology and ecology of sulfate-reducing bacteria. *In: Biology of Anaerobic Microorganism.* Zhender A.J.B. Ed. John Wiley & Sons, New York. 469-585 p.
- WHO: World Health Organization, Geneva. 1987. "Chlorophenols other than Pentachlorophenol". Environmental Health Criteria. Volumen **93**.
- WHO: World Health Organization. 2003. Chemical hazards in drinking-waters chlorophenols. http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/chlorophenols.pdf (Fecha de consulta 21-06-09).
- WHO: World Health Organization. 2003. Chlorophenols in Drinking-water. http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/chlorophenols.pdf (Fecha de consulta 21-06-09).

10. ANEXOS

10.1. CURVA ESTÁNDAR PARA SULFATO (KOLLMERT, 2000)

Determinación de sulfatos

Generalidades

Los sulfatos se encuentran en las aguas naturales en un amplio intervalo de concentraciones. En los sistemas de agua para uso doméstico, los sulfatos no producen un incremento en la corrosión de los accesorios metálicos, pero cuando las concentraciones son superiores a 200 ppm, se incrementa la cantidad de plomo disuelto proveniente de las tuberías.

Si las muestras contienen materia orgánica se deben almacenar en refrigeración o deben ser tratadas con formaldehído. Bajo condiciones alcalinas (un $\text{pH} > 8$) si la muestra contiene sulfitos estos reaccionan con el oxígeno disuelto en el agua y pasan a sulfatos, se evita esta reacción ajustando el pH de la muestra a niveles inferiores a 8.

Este método analiza sulfatos en un intervalo de 0 a 100 ppm, en muestras de agua de uso doméstico, industrial y agrícola.

Principio de la técnica

La muestra es tratada con cloruro de bario en medio ácido formándose un precipitado blanco de sulfato de bario. Se requiere de un solvente acondicionador, que contiene glicerina y alcohol para modificar la viscosidad de la muestra y así permitir que el precipitado de BaSO_4 se mantenga en suspensión produciendo valores de turbidez estables.

La turbidez de este precipitado se mide en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nm y con una celda de 1 cm.

En este método las principales interferencias son los sólidos suspendidos, materia orgánica y sílice, los cuales pueden ser eliminados de las muestras por filtración antes del análisis de sulfato.

Reactivos

Solución ácida acondicionadora

Añadir 50 mL de glicerina a una solución que contenga 30 mL de HCl concentrado, 300 mL de agua destilada, 100 mL de alcohol etílico y 75 g de NaCl.

Se requieren 0.5 g de cristales de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ para cada muestra (la punta de una espátula).

Para la solución patrón 1000 ppm de sulfato:

Se disuelve 1.479 g de Na_2SO_4 secados previamente a 110°C durante dos horas y se afora a 1000 mL con agua desionizada.

La curva de calibración de sulfatos se prepara con los siguientes intervalos 0, 20, 30, 40, 60, 80 y 100 ppm. El blanco se prepara con agua destilada, solución acondicionadora y BaCl_2 .

Para la curva de calibrado se preparan diversas soluciones de concentración en un intervalo de 5 hasta 100 ppm de sulfato, después se toman 10 mL de cada solución patrón y del blanco; se les adicionan 0.4 mL de solución acondicionadora, más la cantidad de BaCl₂ 2H₂O que alcance a tomar la punta de una espátula, se agitan en un vórtex durante 1 minuto, se dejan reposar otro minuto y se mide la absorbancia a 420 nm dentro de los 2 minutos siguientes.

Tabla 17. Soluciones en la elaboración de la curva estándar de Sulfato

| SO₄²⁻ ppm | SO₄ stock | H₂O | Sol Acond | BaCl₂ | V_{final} |
|----------------------------------------|-----------------------------|-----------------------|------------------|-------------------------|--------------------------|
| 0 | 0 mL | 10 mL | 0.4 mL | 0.5 g | 10 mL |
| 20 | 2 mL | 8 mL | 0.4 mL | 0.5 g | 10 mL |
| 30 | 4 mL | 6 mL | 0.4 mL | 0.5 g | 10 mL |
| 40 | 6 mL | 4 mL | 0.4 mL | 0.5 g | 10 mL |
| 80 | 8 mL | 2 mL | 0.4 mL | 0.5 g | 10 mL |
| 100 | 10 mL | 0 mL | 0.4 mL | 0.5 g | 10 mL |

Tratamiento de las muestras

Las muestras se filtran con una membrana de 0.22 μm a continuación se prepara la dilución necesaria de la muestra hasta un volumen final de 10 mL y se trata de la misma forma que las soluciones patrón.

Finalmente se grafica la concentración de cada solución patrón contra la absorbancia obtenida para cada concentración y se linealiza por el método de mínimos cuadrados obteniéndose los parámetros de la recta (Figura 16). La precisión de esta técnica se ha efectuado en estudios entre laboratorios y utilizando una muestra sintética se encontró una desviación estándar relativa de 9% y un error relativo de 1.9%.

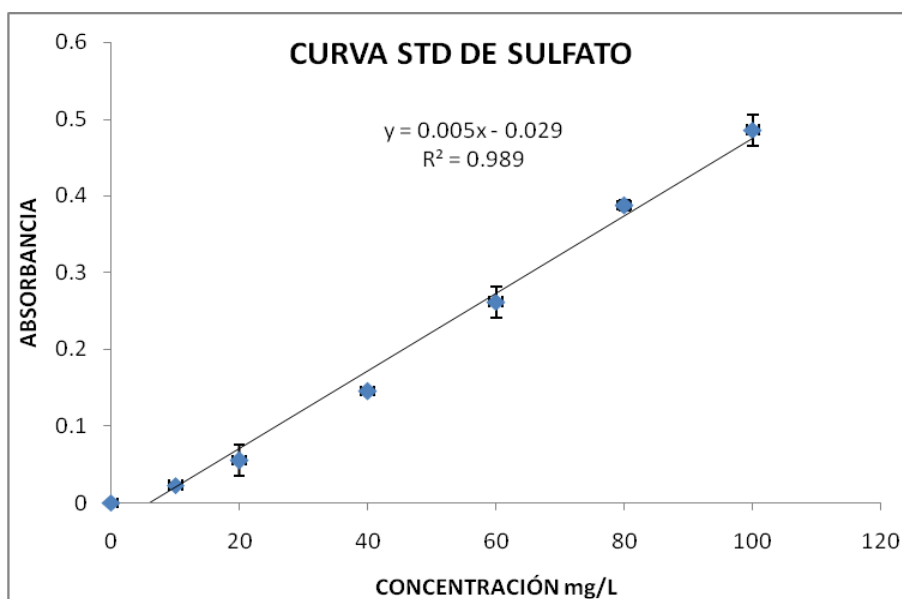


Figura 16.- Curva estándar de sulfato.

10.2. CURVA ESTÁNDAR PARA SULFURO (CORD-RUWISH, 1985)

Las soluciones empleadas para este análisis fueron: solución 5 mM de HCl, para preparar esta solución se utiliza agua desionizada. Por otra parte se prepara un estándar de sulfuro de sodio ($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$), empleando agua reducida previamente durante 15 minutos con una corriente de N_2 . Una vez preparada la solución anterior se realizan soluciones con las siguientes concentraciones: 5, 10, 15, 20 y 25 mM. Cada solución se mezcla con la solución de sulfato de cobre y se lee la absorbancia en un espectrofotómetro (Spectronic) a 480 nm. Posteriormente se gráfica la concentración contra la absorbancia, como se mencionó para la técnica anterior (Figura 17). Cabe mencionar que entre los puntos 0 y 5 mM no se logra detectar sulfuro con precisión, por lo que esta es una limitación de la técnica.

El blanco para la curva es la solución de CuSO_4 .

La curva se prepara utilizando los volúmenes de solución estándar y agua reducida presentes en la Tabla 18, siendo el volumen final 4.1 mL:

Tabla 18. Soluciones en la elaboración de la curva estándar de Sulfuro

| [HS] Molar | V_{STD} (S) | $V_{\text{H}_2\text{O}}$ (reducida) | V_{CuSO_4} |
|------------|----------------------|-------------------------------------|---------------------|
| 0 | 0 μL | 100 μL | 4 mL |
| 5 | 10 μL | 90 μL | 4 mL |
| 10 | 20 μL | 80 μL | 4 mL |
| 15 | 30 μL | 70 μL | 4 mL |
| 20 | 40 μL | 60 μL | 4 mL |
| 25 | 50 μL | 50 μL | 4 mL |

Nota: Conforme se le agregan todas las soluciones se agita inmediatamente con un vórtex.

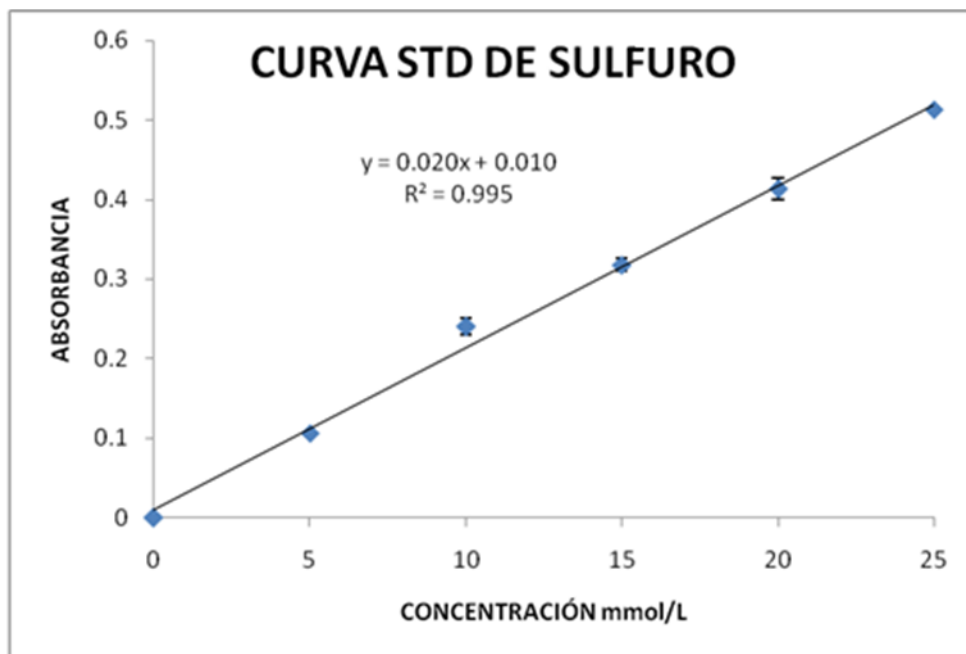


Figura 17. Curva estándar de sulfuro.

10.3 CURVA ESTANDAR PARA LOS COMPUESTOS CARBONADOS (HPLC)

Se emplearon estándares externos para cada compuesto en mezcla, la concentración máxima fue de 50 mg/L. Las soluciones para las curvas de calibración fueron los siguientes: 10, 20, 30, 40 y 50 mg/L de la mezcla de benzoato-fenol-2-CF. Posteriormente fueron analizadas en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC); las condiciones de operación del HPLC se muestran en la siguiente Tabla 19. Las curvas patrón se realizaron de 0 a 50 mg/L por compuesto y las muestras fueron diluidas para que no rebasaran esta concentración para evitar saturar la columna. Se realizaron pruebas para determinar la influencia de la congelación en el almacenamiento de las muestras y se encontró que la concentración disminuye en todas las muestras después de una semana de almacenamiento, por lo que se recomienda que las muestras sean filtradas y refrigeradas durante un tiempo no mayor a 10 días.

Tabla 19. Condiciones de operación del cromatógrafo HPLC.

| CONDICIONES DE OPERACIÓN DEL CROMATOGRAFO HPLC |
|-----------------------------------------------------------------|
| Flujo: 1.2 mL/min |
| Presión: 1200 psi |
| Fase móvil: Acetonitrilo/buffer acetatos 5 mM pH 4.5 (50:50) |
| Fase de almacenamiento de la columna: Acetonitrilo/agua (40:60) |
| Columna: C18 Econophlex |
| Cromatógrafo Thermostepparation con detector UV |
| Absorbancia: 280 nm |
| Tiempo de corrida: 4.5 minutos |
| Método: Fenoles |
| Tiempo de elusión del benzoato: 3 min |
| Tiempo de elusión del fenol: 3.9 min |
| Tiempo de elusión del 2-CF: 4.2 min |

10.3.1 CURVA ESTÁNDAR DE BENZOATO (HPLC)

Para la curva estándar de benzoato, se empleó benzoato de sodio (JT Baker 3500-01), la concentración de la solución estándar fue de 50 mg/L, para construir la curva se hicieron diluciones. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado y a partir de tres soluciones patrones diferentes, los resultados del promedio de cada concentración se muestran en la siguiente Figura 18.

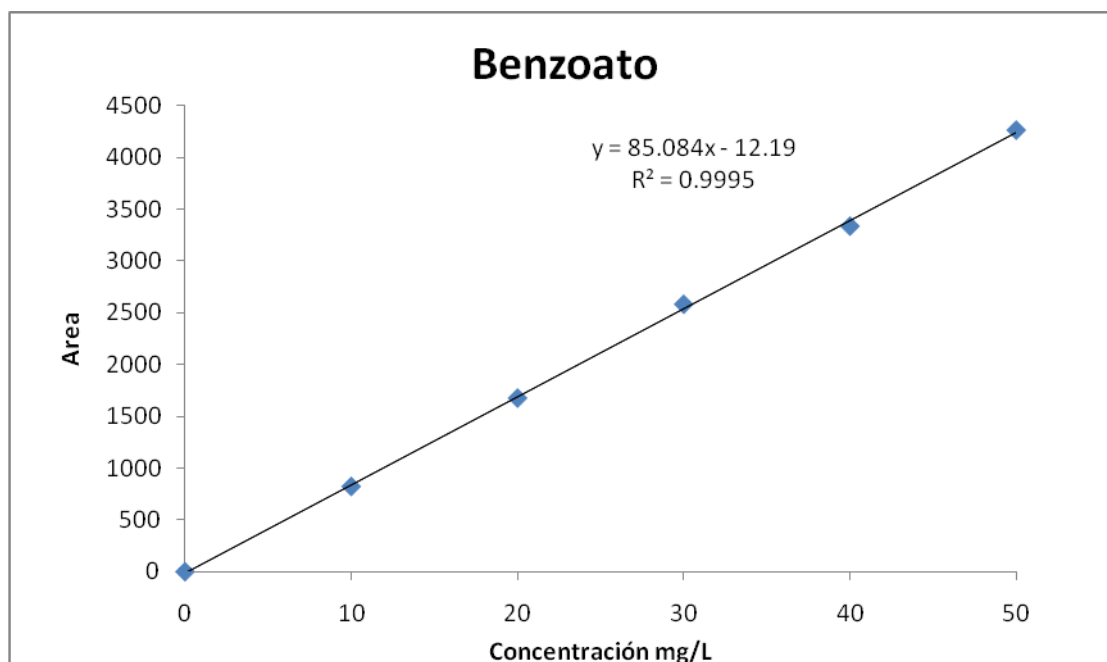


Figura 18. Curva estándar de benzoato.

10.3.2.1 CURVA ESTÁNDAR DE FENOL (HPLC)

Para la curva estándar de fenol, se empleó fenol (JT Baker 2858-01) a una concentración de 50 mg/L, para construir la curva se hicieron diluciones. Las determinaciones fueron por triplicado y a partir de tres soluciones patrones diferentes, los resultados del promedio de cada concentración se muestran en la siguiente Figura 19.

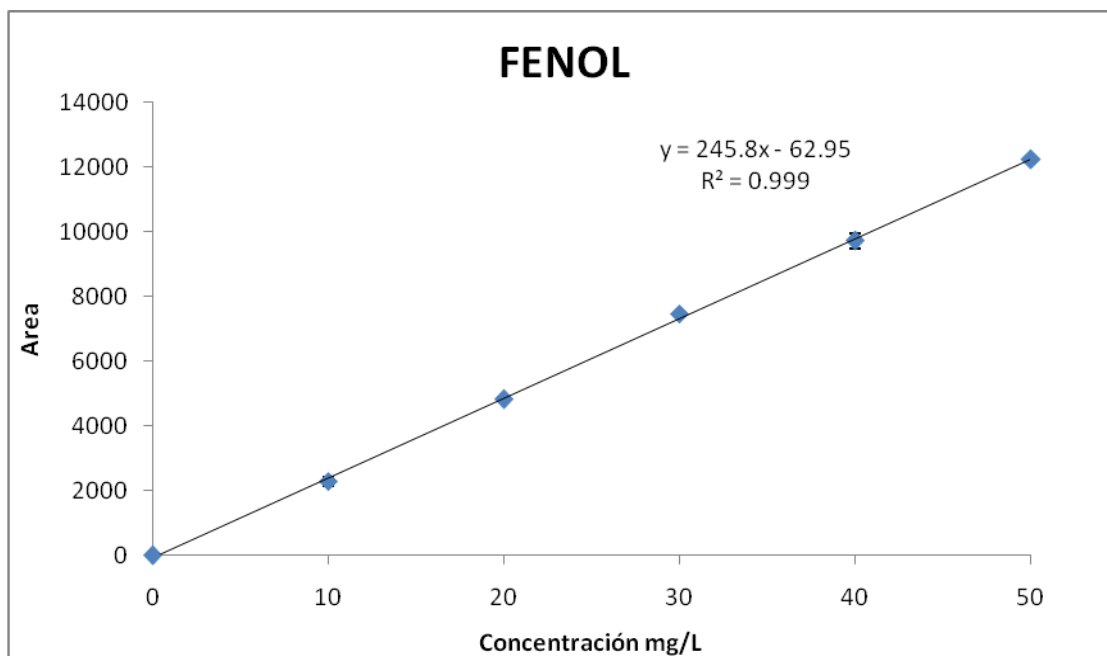


Figura 19. Curva estándar de fenol.

10.3.3.1 CURVA ESTÁNDAR DE 2-CF (HPLC)

Para la curva estándar de 2-CF, se utilizó el reactivo Sigma-Aldrich 18577-9, a una concentración de 50 mg/L, para construir la curva se hicieron diluciones. Las determinaciones fueron por triplicado y a partir de tres soluciones patrones diferentes, los resultados del promedio de cada concentración se muestran en la siguiente Figura 20.

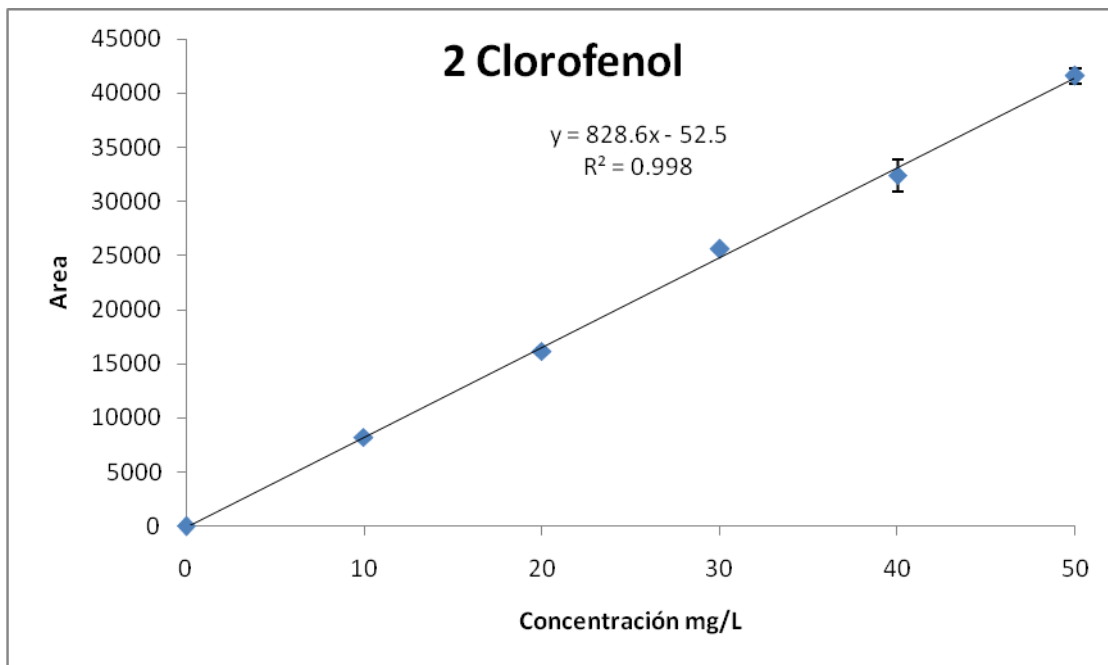


Figura 20. Curva estándar de 2-CF.

11 CÁLCULOS

11.1.1 Operación del reactor

Volumen del reactor= 1.49 L (VR)

Tiempo de retención hidráulica (TRH)

Primera condición (1 día); segunda y tercera condición (2 días).

Flujo= 1 mL/día y 0.5 mL/día

11.1.2 Carga orgánica volumétrica (BV)

$$BV = \frac{0.5 \text{ DQO}}{LR \cdot \text{día}} \quad \text{por lo tanto} \quad [\text{DQO}] = 0.5 \text{ g/L} \cdot \text{d}$$

11.1.3 Relación demanda química de oxígeno/sulfato

$$\frac{[\text{gDQO}]}{[\text{gSO}_4]} = 0.7 \quad \text{y} \quad \frac{[\text{gDQO}]}{[\text{gSO}_4]} = 0.6$$

11.1.4 Gasto (G)

11.1.4.1. Primera condición

$$G = \frac{VR}{TRH} = \frac{1.49 \text{ L}}{1440 \text{ min}} = 0.001034 \frac{\text{L}}{\text{min}} = 1.03 \frac{\text{mL}}{\text{min}}$$

11.1.4.2. Segunda condición

$$G = \frac{VR}{TRH} = \frac{1.49 \text{ L}}{2880 \text{ min}} = 0.000515 \frac{\text{L}}{\text{min}} = 0.515 \frac{\text{mL}}{\text{min}}$$

11.1.5 Inóculo del reactor UASB.

$$\frac{(1.49 \text{ LR})(0.3 \text{ L lodo})}{(3 \text{ LR})} = 0.447 \text{ L lodo} \times \frac{41.2 \text{ gSSV}}{\text{L lodo}} = 20.46 \text{ gSSV} \times \frac{1}{1.49 \text{ LR}} = \frac{13.73 \text{ gSSV}}{\text{LR}}$$

11.1.6 Concentración de sulfato.

11.1.6.1. Primera condición

$$\frac{[0.7 \text{ gDQO}]}{[\text{gSO}_4]} \quad \text{y} \quad \frac{[0.5 \text{ gDQO}]}{\text{L}}$$

$$\frac{0.5 \text{ gDQO}}{\text{L}} \times \frac{\text{gSO}_4}{0.7 \text{ gDQO}} = 0.714 \frac{\text{gSO}_4}{\text{L}}$$

$$0.714 \frac{\text{gSO}_4}{\text{L}} \times \frac{142 \text{ g Na}_2\text{SO}_4}{96 \text{ g SO}_4} = \frac{1.056 \text{ gNa}_2\text{SO}_4}{\text{L}}$$

11.1.6.2. Segunda condición

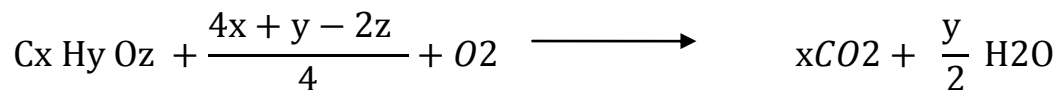
$$\frac{[0.6 \text{ gDQO}]}{[\text{gSO}_4]} \quad y \quad \frac{[0.5 \text{ gDQO}]}{\text{L}}$$

$$\frac{0.5 \text{ gDQO}}{\text{L}} \times \frac{\text{gSO}_4}{0.6 \text{ gDQO}} = 0.833 \frac{\text{gSO}_4}{\text{L}}$$

$$0.833 \frac{\text{gSO}_4}{\text{L}} \times \frac{142 \text{ g Na}_2\text{SO}_4}{96 \text{ g SO}_4} = \frac{1.23 \text{ g Na}_2\text{SO}_4}{\text{L}}$$

11.2 Concentración para la alimentación de cada compuesto de la mezcla

Se utilizó la fórmula propuesta por Rittmann:



11.2.1.1 Benzoato (g)

Benzoato $\text{C}_7 \text{H}_5 \text{O}_2$

P.M. 121 g/mol

Pureza 99.9%

$$4(7) + 5 - 2(2)$$

$$\frac{28 + 5 - 4}{4} = 7.25 \text{ mol de Oxígeno}$$

$$\frac{\text{gDQO}}{\text{g Bnz}}$$

$$\frac{7.25 \text{ O}_2 \text{ mol}}{\text{mol Bz}} \times \frac{32 \text{ g O}_2}{\text{mol}} \times \frac{\text{mol}}{121 \text{ g Bz}} = 1.91 \text{ g DQO}$$

11.2.1.2 Fenol (g)

Fenol C₆ H₆ O

P.M. 94.11 g/mol

Pureza 99 %

$$\frac{4(6) + 6 - 2}{24 + 6 - 2} = 7 \text{ mol de Oxígeno}$$
$$\frac{gDQO}{g \text{ fenol}}$$

$$\frac{7.02 \text{ mol}}{\text{mol Fenol}} \times \frac{32 \text{ g O}_2}{1 \text{ mol}} \times \frac{\text{mol}}{94.1 \text{ g Fenol}} = 2.38 \text{ g DQO}$$

11.2.1.3 2-CF (g)

2-CF C₆ H₄ OH Cl

P.M. 128.56 g/mol

Pureza 99.9%

$$\frac{4(6) + 6 - 2}{24 + 6 - 2} = 7 \text{ mol de Oxígeno}$$

$$\frac{gDQO}{g \text{ fenol}}$$

$$\frac{7.02 \text{ mol}}{\text{mol fenol}} \times \frac{32 \text{ g O}_2}{1 \text{ mol}} \times \frac{\text{mol}}{94.1 \text{ g Fenol}} = 2.38 \text{ g DQO}$$

11.3 Proporción del benzoato para cada condición.

11.3.1 Primera condición:

$$\frac{0.5 \text{ gDQO}}{\text{L}} \times 10\% = 0.05 \frac{\text{gDQO}}{\text{L}}$$

$$0.05 \frac{\text{gDQO}}{\text{L}} \times \frac{\text{g/mol Bnz}}{1.91 \text{ gDQO}} = 0.026 \frac{\text{g/mol Bnz}}{\text{L}}$$

$$0.026 \frac{\text{g/mol Bnz}}{\text{L}} \times \frac{144.1 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \text{ BnzNa}}{121.1 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \text{ Bnz}} = 0.031 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \text{ BnzNa}$$

11.3.2 Segunda condición:

$$\frac{0.5 \text{ gDQO}}{\text{L}} \times 75\% = 0.375 \frac{\text{gDQO}}{\text{L}}$$

$$0.375 \frac{\text{gDQO}}{\text{L}} \times \frac{\text{g/mol Bnz}}{1.91 \text{ gDQO}} = 0.196 \frac{\text{g/mol Bnz}}{\text{L}}$$

$$0.196 \frac{\text{g/mol Bnz}}{\text{L}} \times \frac{144.1 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \text{ BnzNa}}{121.1 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \text{ Bnz}} = 0.234 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \text{ BnzNa}$$

11.3.3 Tercera condición:

$$\frac{0.5 \text{ gDQO}}{\text{L}} \times 30\% = 0.15 \frac{\text{gDQO}}{\text{L}}$$

$$0.15 \frac{\text{gDQO}}{\text{L}} \times \frac{\text{g/mol Bnz}}{1.91 \text{ gDQO}} = 0.078 \frac{\text{g/mol Bnz}}{\text{L}}$$

$$0.078 \frac{\text{g/mol Bnz}}{\text{L}} \times \frac{144.1 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \text{ BnzNa}}{121.1 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \text{ Bnz}} = 0.093 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \text{ BnzNa}$$

11.4 Proporción del fenol para cada condición.

11.4.1 Primera condición:

$$\frac{0.5 \text{ gDQO}}{\text{L}} \times 75\% = 0.375 \frac{\text{gDQO}}{\text{L}}$$

$$0.375 \frac{\text{gDQO}}{\text{L}} \times \frac{\text{g/mol Fenol}}{2.38 \text{ gDQO}} = 0.157 \frac{\text{g/mol Fenol}}{\text{L}}$$

11.4.2 Segunda condición:

$$\frac{0.5 \text{ gDQO}}{L} \times 15\% = 0.075 \frac{\text{gDQO}}{L}$$

$$0.075 \frac{\text{gDQO}}{L} \times \frac{\text{g/mol Fenol}}{2.38 \frac{\text{gDQO}}{\text{mol}}} = 0.0315 \frac{\text{g/mol Fenol}}{L}$$

11.4.3 Tercera condición:

$$\frac{0.5 \text{ gDQO}}{L} \times 52.6\% = 0.263 \frac{\text{gDQO}}{L}$$

$$0.263 \frac{\text{gDQO}}{L} \times \frac{\text{g/mol Fenol}}{2.38 \frac{\text{gDQO}}{\text{mol}}} = 0.110 \frac{\text{g/mol Fenol}}{L}$$

11.5 Proporción del 2-CF para cada condición.

11.5.1 Primera condición:

$$\frac{0.5 \text{ gDQO}}{L} \times 15\% = 0.075 \frac{\text{gDQO}}{L}$$

$$0.075 \frac{\text{gDQO}}{L} \times \frac{\text{g/mol Fenol}}{2.38 \frac{\text{gDQO}}{\text{mol}}} = 0.031 \frac{\text{g/mol Fenol}}{L}$$

$$0.031 \frac{\text{g/mol Fenol}}{L} \times \frac{128.56 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \text{2-CF}}{94.1 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \text{Fenol}} = 0.043 \text{ g/mol 2-CF}$$

11.5.2 Segunda condición:

$$\frac{0.5 \text{ gDQO}}{L} \times 10\% = 0.05 \frac{\text{gDQO}}{L}$$

$$0.05 \frac{\text{gDQO}}{L} \times \frac{\text{g/mol Fenol}}{2.38 \frac{\text{gDQO}}{\text{mol}}} = 0.021 \frac{\text{g/mol Fenol}}{L}$$

$$0.021 \frac{\text{g/mol Fenol}}{L} \times \frac{128.56 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \text{2-CF}}{94.1 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \text{Fenol}} = 0.0287 \text{ g/mol 2-CF}$$

11.5.3 Tercera condición:

$$\frac{0.5 \text{ gDQO}}{L} \times 17.4\% = 0.087 \frac{\text{gDQO}}{L}$$

$$0.087 \frac{\text{gDQO}}{L} \times \frac{\text{g/mol Fenol}}{2.38 \frac{\text{gDQO}}{\text{g/mol Fenol}}} = 0.036 \frac{\text{g/mol Fenol}}{L}$$

$$0.021 \frac{\text{g/mol Fenol}}{L} \times \frac{128.56 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \text{2-CF}}{94.1 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \text{Fenol}} = 0.05 \text{ g/mol 2-CF}$$

12. TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS

García Cruz, U.; Cano Velasco, L.; Celis García, L.; Poggi Varaldo, H.; Gómez Hernández, J.; Meraz, M. 2008. Chlorophenols toxicity on sulfate reducing biofilms. En Memorias IX Tallery Simposio Latinoamericano de Digestión Anaerobia. Chile. IWA. pp. 199-204.

García Cruz, U.; Cano Velasco, L.; Celis García, L.; Poggi Varaldo, H.; Gómez Hernández, J.; Meraz, M. 2009. Toxicidad de clorofenoles sobre biopelícula sulfato reductora. En memorias XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras. Acapulco, Guerrero, México.

CHLOROPHENOLS TOXICITY ON SULFATE REDUCING BIOFILMS

García Cruz, U. ^{*}; Cano Velasco, L. ^{*}; Celis García, L. [†]; Poggi Varaldo, H. [‡]; Gómez Hernández, J., Meraz, M. ^{*}

^{*}Laboratory for Waste Water Treatment, Dept. of Biotechnology, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, México 09340. (meraz@xanum.uam.mx)

[†]Div. de Ciencias Ambientales, Instituto Potosino de Investigación Científica, SLP, México.

[‡]Depto. de Biotecnología, CINVESTAV, México.

Abstract: The effect of the herbicide 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4D) and its possible intermediaries: 2,4-dichlorophenol (2,4DCF), 4-chlorophenol (4CF), 2-chlorophenol (2CF) and phenol, on sulfate and ethanol utilization were evaluated at different concentrations levels on biofilms formed in a down flow fluidized bed reactor (DFFBR) fed with ethanol (DQO/SO₄²⁻=2.0). High concentrations of toxics showed an adverse effect on the sulfate reduction rate and ethanol conversion to acetate, the Y_{ac/don} values diminished as the toxic concentration increased affecting the sulfate respiratory process and electrons transfer. Also, the degree of ethanol and sulfate utilization was affected by the toxic structure complexity, the number of chloride atoms as much as by chloride position in the phenolic ring. IC₅₀ values showed that the highest toxicity was found when 2,4DCF was added followed by 2,4D>2CF>4CF and phenol.

Keywords: chlorofenols, physiology, toxicity, sulfate reduction.

INTRODUCTION

Mono or polysubstituted chlorophenols are recalcitrant chemical compounds widely distributed in terrestrial and aquatic environments actually through the extensive use as solvents, additives, grease removers, cleaning agents, herbicides and as intermediaries in the pulp and paper bleaching process (Bhatt *et al.*, 2007; Field and Sierra-Alvarez, 2007). Due to its persistence tend to bioaccumulate, therefore being classified as dangerous organic substances that require immediate action through the reduction of emissions and discharges (Bhatt *et al.*, 2007), for human health and environment protection. These chemicals may be transported to water bodies and environments where sulfate reducing bacteria (SRB) may be found, and cause toxicity and inhibition on sulfate respiration.

Very early it was demonstrated that biological dehalogenation of chlorophenolic compounds (hydrogenolysis or the substitution of Cl⁻ by a H⁺), was carried out before phenol oxidation and that this process was accompanied by sulfide production through a non assimilative respiratory pathway (King, 1988). After reductive dehalogenation, some SRB are able to oxidize these chemicals through a metabolic process that implies electrons transferred from an electron donor to the aromatic ring (Mohn and Tiedje, 1992). Nevertheless, the presence of sulfate and other sulfoxianions as thiosulfate, may cause the partial or total inhibition of aromatic compounds reductive dehalogenation, due to the competition between the sulfoxianion and the aromatic ring for the donor electrons, in such a way that the whole process, dehalogenation and oxidation, may be stimulated by the addition of electron donors that act as inducers, such as lactate, acetate, pyruvate, ethanol, glucose and H₂ (De Weerd *et al.*, 1990).

The aim of this investigation was to evaluate the sulfate respiratory process in the presence of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4D) and its most common intermediaries: 2,4-dichlorophenol (2,4DCF), 4-chlorophenol (4CF), 2-chlorophenol (2CF) y phenol, and determine the IC₅₀ values as a function of the acceptor/donor utilization rate on sulfate reducing biofilm using ethanol as inducer or an alternative electron donor.

METHODS

SRB enrichment

Flocculent anaerobic sludge from a municipal WWTP was used to obtain a sulfate reducing biomass in a UASB reactor (1.47 L) that was inoculated with 0.5 L sludge, fed with lactate and mineral medium (Visser, 1995) at pH 6.0, COD/SO₄ ratio of 0.76 and HRT of 2 days. The highest and stable sulfate reducing activity was obtained after a month of operation.

Biofilm cultivation

The biofilm was obtained during batch operation of a DFFB reactor (L/D = 15) by 16 days until an immobilized biomass concentration of 0.8 kgIVS/m³ dry support was attained. The inoculum of the fluidized bed consisted of 0.025 L of the SRB enrichment from the UASB reactor. After the maximum biomass concentration was obtained, the reactor was operated in continuous to a stationary stage at HRT of 1 day. In this case ethanol was used as carbon source at a ratio for ethanol and sulfate of 2.

Toxicity assays

The assays were carried out in duplicate in 60 mL serological bottles by adding 25 mL of mineral medium and 10 mL of immobilized support. Bottles were stoppered and sealed followed by gas phase exchange done with N₂:CO₂ (80:20). Finally, 5 mL of concentrated solutions of ethanol, sulfate and chlorophenols were added at different concentration levels, as shown in Table 1.

Table 1. Concentration levels of chlorophenols tested in toxicity assays.

| | ppm | | | | |
|----------|-----|-----|-----|------|------|
| 2,4DCF | 10 | 25 | 50 | 75 | 125 |
| 2,4D | 5 | 10 | 25 | 50 | 75 |
| 4CF, 2CF | 25 | 75 | 150 | 300 | 600 |
| Phenol | 150 | 300 | 600 | 1200 | 2400 |

COD/SO₄ ratio was kept around 2, considering the COD added by the benzene ring. The respiratory process was evaluated during 72 hours in 12 hours intervals through the measurement of sulfate and ethanol utilization, and sulfide and acetate production. Assays were set at 30°C without shaking.

In order to find out the IC₅₀ values for each toxic, the volumetric sulfate utilization rates, q_{max}, in the presence of toxics at each concentration level were determined through the Gompertz model. Also a yield, Y_{ac/don}, that relates the amount of electron acceptor with the amount of electron donor consumed (mmol electron acceptor_{consummed}:mmol electron donor_{consummed}⁻¹) during the exposition time, was established to evaluate the effect of the toxics addition on the sulfate respiratory process.

Analytical techniques

Ethanol and acetate were quantified by FID gas chromatography (Hewlett Packard 5890 series II) equipped with an AT-1000 Alltech capillary column (0.53 mm x 10 m). Chlorophenols were quantified by HPLC (Waters 2996) equipped with a diode detector (Waters PDA 600) at 280 nm and an Econosphere C18 reverse phase column (5 μ particle size, 4.6 mm x 250 mm) with a 50:50 acetate acetonitrile 5 mM mobile phase. Sulfate was quantified with BaCl₂ (Kolmert *et al.*, 2000) and sulfide by Cord-Ruwish (1985) technique.

RESULTS AND DISCUSSION

Biofilm formation and DFFBR performance

After batch operation and during stationary phase, immobilized biomass remained at a concentration of 0.808 \pm 0.261 kgIVS/m³ dry support. The ethanol conversion efficiency was around 88% and was oxidized to acetate at concentrations near the stoichiometry yield, and was not mineralized, since only trace concentrations of HCO₃⁻ were found and no CO_{2(g)} was detected. A mass balance showed a lack of carbon around 15% that probably was used for biomass and EPS synthesis.

Table 2. Mass balances for ethanol and by products, sulfate and sulfide, during the continuous operation of the fluidized bed.

| Influent (mmol L ⁻¹) | Effluent (mmol L ⁻¹) | | | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------|---------------------------------|-------------|
| C-ethanol | C-ethanol | C-acetate | C-HCO ₃ ⁻ | % Recovered |
| 54.6 | 6.78 | 39.29 | 0.329 | 85 |
| S-SO ₄ ⁻² | S-SO ₄ ⁻² | S-HS ⁻ | | % Recovered |
| 11.84 | 3.83 | 7.43 | | 95 |

Sulfate conversion was of 80% \pm 3.2 while sulfide concentration showed some variability in the effluent. Recovered sulfur was of 95%. The sulfate reducing rate, q_{\max} , was around 0.522 mmol L⁻¹ h⁻¹, and the yield of the respiratory process, $Y_{\text{acc/don}}$, was of 0.58 mol mol⁻¹, for the continuous stage.

Toxicity of chlorophenols on sulfate reducing biofilms

As an example, Figure 1 shows the consumption pattern followed by sulfate and ethanol when the biofilm was exposed to several concentrations of 2,4DCF, the intermediary that turned out to be the most toxic compound. The sulfate reduction as well as the ethanol oxidation rates diminished as toxic concentration increased from 10 to 125 ppm.

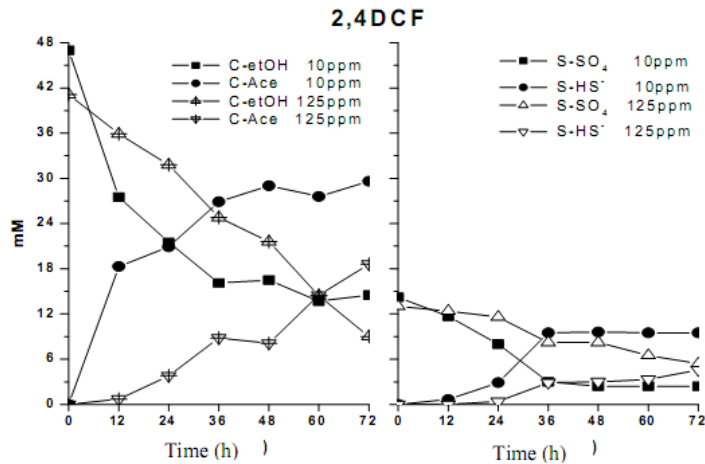


Figure 1. Sulfate reducing biofilm ethanol and sulfate consumption pattern exposed to 2,4DCF at 10 and 125 ppm.

The same pattern was found for all toxicity assays, the sulfate reduction rate diminished along with the ethanol consumption pattern, as toxic concentration level increased, as can be seen in Table 3. None of the herbicide intermediaries added or the herbicide itself, were degraded during exposure time in the toxicity assays; concentrations levels tested remained the same throughout the experiments and no dehalogenation was detected.

Holliger *et al.* (2003), had pointed out that enzymes responsible of reductive dehalogenation as well as phenol degradation, are induced when microbial cultures have been exposed to these compounds and subsequently may exhibit the capacity to remove the halogen, than cultures that have not been exposed to these compounds.

In the case of the herbicide 2,4D, not even the fenoxi bond was hydrolyzed, that is the common first step in the degradation pathway as stated before by Gibson y Suflita (1993). For this toxic, a diminution of 77% on sulfate reduction rate was found while $Y_{acc/don}$ diminished 20% when 75 ppm were added, IC_{50} was around 29 ppm. At 50 ppm a diminution of q_{max} found was similar to that of 2,4DCF, while $Y_{acc/don}$ diminished at lower values than 2,4DCF at the same concentration. IC_{50} for 2,4DCF turned out to be the lowest between all toxics indicating the highest toxicity level (see Table 3).

Table 3. Yields, sulfate reduction rates and IC₅₀ values obtained for each toxic at all concentrations levels.

| | 2,4DCF | | 2,4D | | 2CF | | 4CF | | Phenol | |
|------------------|----------------------|------------------|----------------------|------------------|----------------------|------------------|----------------------|------------------|----------------------|------------------|
| | Y _{acc/don} | q _{max} | Y _{acc/don} | q _{max} | Y _{acc/don} | q _{max} | Y _{acc/don} | q _{max} | Y _{acc/don} | q _{max} |
| control | 0.75 | 0.66 | 0.58 | 0.52 | 0.58 | 0.52 | 0.75 | 0.66 | 0.75 | 0.66 |
| -[ppm] | 0.72 | 0.44 | 0.59 | 0.38 | 0.63 | 0.32 | 0.71 | 0.55 | 0.45 | 0.32 |
| ↓ | 0.62 | 0.22 | 0.54 | 0.3 | 0.63 | 0.28 | 0.65 | 0.48 | 0.38 | 0.27 |
| ↓ | 0.52 | 0.21 | 0.5 | 0.28 | 0.51 | 0.20 | 0.54 | 0.17 | 0.47 | 0.24 |
| ↓ | 0.54 | 0.21 | 0.48 | 0.18 | 0.43 | 0.17 | 0.52 | 0.12 | 0.46 | 0.24 |
| +[ppm] | 0.47 | 0.16 | 0.46 | 0.12 | 0.17 | 0.09 | 0 | 0 | 0.49 | 0.11 |
| IC ₅₀ | 17.4 | | 29.0 | | 99.8 | | 108.0 | | 143.8 | |

Y_{acc/don}: mmol mmol⁻¹; q_{max}: mmol SO₄²⁻ L⁻¹ h⁻¹; IC₅₀: ppm.

Monochlorinated phenols such as 2CF and 4CF exhibited similar toxicity effects at the same concentration. At 300ppm, 4CF inhibited 30% of the respiratory process and the same effect at the same concentration level was found for 2CF (see yield values). In contrast the q_{max} for 4CF decayed in 80%, contrary to that obtained for 2CF that diminished only 32%. At 600ppm, 4CF inhibited completely sulfate reduction and ethanol conversion, while 2CF inhibited 82% of the respiratory process and yield diminished in 70%. IC₅₀ for both toxic compounds was similar.

Nevertheless, regardless IC₅₀ values, can be considered that 2CF was less toxic than 4CF, since at 600 ppm the respiratory process was completely inhibited or 4CF, indicating the influence of Cl⁻ position, which agrees with reports by Beltrame *et al.* (1988) and Ennik-Maarsen *et al.* (1998). In other studies, Blum y Speece (1991a) found out that Cl⁻ in the *para*- or *meta*- position exerted a higher toxicity than the *orto*- isomer. At the contrary, has been reported that for methanogenic bacteria 2CF may be more toxic than 4CF (Blum y Speece 1991b).

Phenol was the less toxic compound tested since at 2400 ppm, q_{max} showed a diminution of 83%, while Y_{aid} diminished only 34% at this concentration level, IC₅₀ found was of 143.8 ppm and was not oxidized or degraded by the biofilm during the assay.

Chlorine atoms number on the benzene ring, position and complexity and chemical structure, exerted an acute toxicity effect on sulfate reduction, since 2,4D and 2,4DCF showed the lowest IC₅₀ values, while monochlorinated compounds diminished sulfate reducing rate in 75% at toxic amounts four times lower. IC₅₀ values found indicated that the highest toxicity was observed for 2,4DCF followed by 2,4D>2CF>4CF and phenol.

CONCLUSIONES

Chlorophenols affect the sulfate respiratory activity of the biofilm, inhibiting both biological processes: sulfate reduction and ethanol oxidation. The culture immobilized with ethanol and not acclimated to the toxic compounds was unable to degrade any of them, nor even at very low concentrations when an alternative electrons source or inducer is added. Phenol low toxicity effect on the sulfate respiration indicates also that chloride is the source of toxicity to sulfate reduction and that the number of chloride atoms and structural complexity of the toxic compound increased toxicity levels.

REFERENCES

- Beltrame P., Beltrame, P. L., Carniti, P., Guardione, D., and Lanzetta, C. (1988) Inhibiting action of chlorophenols on biodegradation of phenols and its correlation with structural properties of inhibitors. *Biotechnol. and Bioengin.*, 31:821-828
- Bhatt, P., Kumar, M.S., Mudliar, S. and Chakrabarti, T. (2007). *Biodegradation of Chlorinated Compounds-A review. Critical Reviews in Environmental Science and Technology.* 37:165-198.
- Blum, D.J.W. and Speece, R.E. (1991a). Quantitative structure-activity relationships for chemical toxicity to environmental bacteria. *Ecotox. and Environ. Safety.* 22:198-224.
- Blum D.J.W. and Speece, R.E. (1991b). A database of chemical toxicity to environmental bacteria and its use in interspecies comparisons and correlations. *Res. J. Water Pollut. Control. Fed.* 63(3):198-207.
- Cord-Ruwisch R. (1985) A quick method for determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *J. Microbiol. Meth.* 4: 33-6.
- De Weerd, K.A., Mandelco, L., Tanner, R., Woese, C., and Suflita, J. (1990). *Desulfomonile tiedji* ge. nov. and sp. nov., a novel anaerobic dehalogenating, sulfate reducing bacteria. *Arch. Microbiol.* 154:23-30.
- Ennik-Marsen, K.A., Louwense, A., Roelofsen, W. and Stams, A. J. M. (1998). Influence of monochlorophenols on methanogenic activity in granular sludge. *Wat. Res.* 32(10):2977-2982.
- Field, J.A. and Sierra-Alvarez, R. (2007). Microbial degradation of chlorinated phenols. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* DOI.10.1007/s11157-007-9124-5.
- Gibson, S. A. and Suflita, J. M., (1990). Anaerobic biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid in samples from a methanogenic aquifer: stimulation by short-chain organic acids and alcohols. *Appl. Environ. Microb.* 56(6):1825-1832.
- Gibson, S. A. and Suflita, J. M., (1993). Role of electron-donating cosubstrates in the anaerobic biotransformation of chlorophenoxyacetates to chlorophenols by a bacterial consortium enriched on phenoxyacetate. *Biodegradation.* 4:51-57
- Hägglöf, M.M. and Dossert, I.D. (2003) Dehalogenation: Microbial Processes and Environmental Applications. Chapter 5. in *Dehalogenation by anaerobic bacteria.* Holliger, C., Regeard, C. and Diekert, G. (Ed) pp. 115-158.
- King, G.M. (1988). Dehalogenation in marine sediments containing natural source of chlorophenols. *Appl. Environ. Microb.* 54: 379-385.
- Kolmert Å, Wikström P and Hallberg K. (2000) A fast and simple turbidimetric method for the determination of sulfate in sulfate-reducing bacterial cultures. 41: 179-184.
- Mohn, W. and Tiedje J.M. (1992). Microbial reductive dehalogenation. *J. Microbiol. Meth. n. Microbiol. Rev.* 56:482-507.
- Visser, A. (1995). The anaerobic treatment of sulfate containing wastewater. Ph.D. Thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.
-



TOXICIDAD DE CLOROFENOLES SOBRE BIOPELÍCULA SULFATO REDUCTORA

Ulises García¹, Luis Cano², Héctor Poggy, Jorge Gómez, Mónica Meraz
 Depto. de Biotecnología. UAM-Iztapalapa. Av. Sn. Rafael Atlixco #186, Col. Vicentina, Iztapalapa. México
 D.F. 09340. Tel. y Fax: 58-04-47-23. Mail: duma@xanum.uam.mx

Palabras clave: *clorofenoles, biopelícula, toxicidad, sulfato reducción.*

Introducción. Los clorofenoles mono o polisustituídos son compuestos recalcitrantes, los cuales han sido ampliamente distribuidos en ambientes terrestres y acuáticos a través del uso extensivo como solventes, aditivos, desengrasantes, agentes limpiadores, herbicidas y como intermediarios en el proceso del blanqueo de papel. Debido a su persistencia y bioacumulación, se clasifican como sustancias orgánicas peligrosas que requieren acción inmediata a través de medidas de reducción de emisiones y descargas, para la protección de la salud humana y del ambiente. Este tipo de compuestos al ser transportados a cuerpos de agua y a ambientes donde se encuentran bacterias sulfato reductoras (BSR), pueden causar inhibición de la respiración del sulfato.

El objetivo de esta investigación fue evaluar la CI_{50} en función de la velocidad máxima de consumo (q_{max}) de diferentes clorofenoles: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D), 2,4-diclorofenol (2,4DCF), 4-clorofenol (4CF), 2-clorofenol (2CF) y fenol, considerando una biopelícula sulfato reductora y utilizando etanol como fuente de electrones y energía.

Metodología. Las cinéticas se llevaron a cabo en lote utilizando botellas serológicas de 60 mL por duplicado. Se les agregaron 25 mL de medio Visser (1995), 10 mL de soporte con biopelícula sulfato reductora y se intercambio la atmosfera con $N_2:CO_2$ (80:20). El proceso respiratorio en presencia de los clorofenoles se evaluó durante 72 horas en intervalos de 12 horas a través del consumo con respecto al tiempo de sulfato y etanol y de la producción de sulfuro y acetato. La CI_{50} fue calculada utilizando el modelo reportado por Barrera-Cortez *et al.* (2006). La q_{max} se calculó utilizando el modelo Gompertz.

Resultados y discusión. Los resultados del efecto de los tóxicos se resumen en la Tabla 1. En todas las cinéticas se encontró que conforme la concentración aumenta la velocidad de consumo de sulfato disminuye a la par que disminuye el consumo de etanol.

Tabla 1. Valores de q_{max} e CI_{50} por compuesto

| 2,4DCP | | 2,4D | | 2CP | | 4CP | | Phenol | |
|-----------|-----------|------|-----------|-----|-----------|------|-----------|--------|-----------|
| ppm | q_{max} | ppm | q_{max} | ppm | q_{max} | ppm | q_{max} | ppm | q_{max} |
| 0 | 0.66 | 0 | 0.52 | 0 | 0.52 | 0.66 | 0 | 0 | 0.66 |
| 10 | 0.44 | 5 | 0.38 | 25 | 0.32 | 0.55 | 150 | 0.32 | |
| 25 | 0.22 | 10 | 0.3 | 75 | 0.28 | 0.48 | 300 | 0.27 | |
| 50 | 0.21 | 25 | 0.28 | 150 | 0.20 | 0.17 | 600 | 0.24 | |
| 75 | 0.21 | 50 | 0.18 | 300 | 0.17 | 0.12 | 1200 | 0.24 | |
| 125 | 0.16 | 75 | 0.12 | 600 | 0.09 | 0 | 2400 | 0.11 | |
| CI_{50} | 15.8 | | 21.2 | | 78.8 | | 108 | | 164.7 |

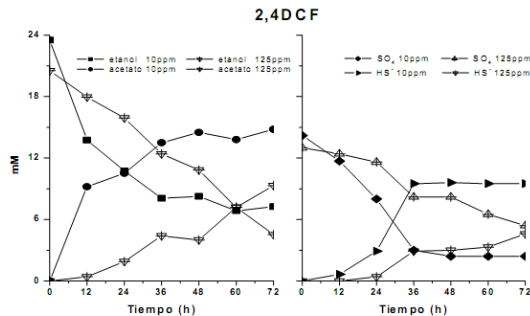


Figura 1. Efecto del 2,4DCF a una concentración de 10 y 125 mg/L en el consumo de etOH y SO₄.

Como se ejemplifica en la Figura 1, la concentración creciente del tóxico, en este caso 2,4DCF disminuye la capacidad sulfato reductora de la biopelícula. La biopelícula cultivada en etanol no degrada el tóxico, esto indica que a pesar de que la biopelícula se ha formado y las partículas muestran actividad sulfato reductora sobre un sustrato carbonado, no tienen la capacidad para degradar el tóxico ni para deshalogenar. el 2,4DCF o 2,4D son más tóxicos al proceso respiratorio que los compuestos monoclorados, disminuyendo la velocidad sulfato reductora en 75% con cantidades de tóxico cuatro veces menores.

Conclusiones. Los compuestos clorofenólicos afectan la actividad sulfato reductora sobre etanol, disminuyéndola. Los valores de CI_{50} mostraron que la mayor toxicidad fue observada para 2,4DCF seguida de 2,4D>2CF>4CF y por último Fenol.

Agradecimiento. A CONACyT¹ (beca 181013) y el ICyTDF² por el apoyo brindado.

Bibliografía.

- Bhatt, P., Kumar, M.S., Mudliar, S. y Chakrabarti, T. (2007). *Biodegradation of Chlorinated Compounds-A review. Critical Reviews in Environmental Science and Technology.* **37**,165-198.
- Field, J.A. and Sierra-Alvarez, R. (2008). Microbial degradation of chlorinated phenols. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **7**, 211-241.
- Barrera-Cortés, J., Manilla-Pérez, E. and Poggy-Valardo, H. (2006). Oxygen transfer to slurries treated in a rotating drum operated at atmospheric pressure. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* **29**:391-398



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

No. 00069
Matrícula: 208280313

DEGRADACION DE 2-CLOROFENOL
BAJO CONDICIONES DE
SULFATO-REDUCCION EN UN
REACTOR UASB

En México, D.F., se presentaron a las 12:00 horas del día 16 del mes de julio del año 2010 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MONICA ALICIA MERAZ RODRIGUEZ
DRA. PATRICIA CASTILLA HERNANDEZ

siendo la primera asesora del alumno y lectora la segunda, de la Idónea Comunicación de Resultados, se reunieron a evaluar la presentación cuya denominación aparece al margen, para la obtención del diploma de:

ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA

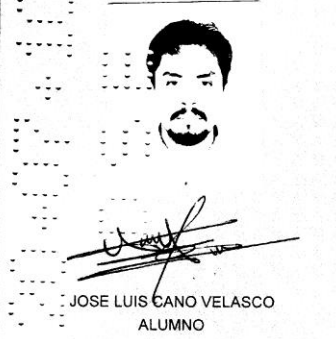
DE: JOSE LUIS CANO VELASCO

y de acuerdo con el artículo 79 fracción II del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

A P R O B A R

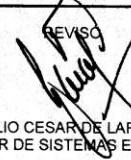
Acto continuo, se comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



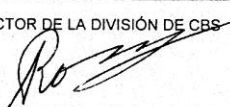
JOSE LUIS CANO VELASCO
ALUMNO

REVISÓ



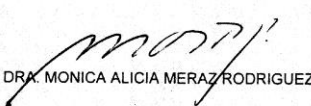
LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS




DR. RUBEN ROMAN RAMOS

ASESORA



DRA. MONICA ALICIA MERAZ RODRIGUEZ

LECTORA



DRA. PATRICIA CASTILLA HERNANDEZ