

2
21

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**PARTICIPACION DE PEROXIDASA EN SISTEMAS
DE TRATAMIENTO DE AGUAS DE LA
INDUSTRIA QUIMICA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA EN ALIMENTOS
P R E S E N T A :
BEATRIZ BARBA SILVA



MEXICO, D. F.

1997

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Prof. Raúl Aguilar Caballero
Vocal: Prof. Eduardo Bárzana García
Secretario: Prof. Agustín López- Munguía Canales
1er. Suplente: Prof. José Mariano García Garibay
2o. Suplente: Prof. Amelia Ma. de Gpe. Farres González Saravia

Lugar donde se desarrolló la tesis:

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA,
FACULTAD DE QUÍMICA.
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Director de tesis:



Dr. Eduardo Bárzana García

Sustentante:



Beatriz Barba Silva

AGRADECIMIENTOS.

Al Dador de toda dádiva buena y todo don perfecto por dejarme ser.

A la UNAM y de manera especial a la Facultad de química a quién debo mi formación profesional.

Al Dr. Eduardo Búzana Garcia por sus consejos, paciencia y tiempo para revisar este trabajo.

A mis amigos y amigas con quienes pase ratos felices y con los que compartí la dura carga de trabajo: Adriana D., Roxana D., Paula G., Lety T., Carmén S., Rocio , Héctor C., Heber C., Jorge R., etc .

A Lety Ramírez por sus amables consejos en la realización de este trabajo.

De manera especial a mi familia.

CONTENIDO

Lista de Tablas	iii
Lista de Figuras	iii
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO 1. GENERALIDADES	
1.1 CARACTERÍSTICAS DE UN AGUA RESIDUAL	4
1.2 MÉTODOS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES	6
1.3 TRATAMIENTO ENZIMÁTICO	13
1.4 PEROXIDASA DE RÁBANO	16
1.5 OBJETIVOS	18
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1 EQUIPO Y MATERIAL	19
2.2 METODOLOGÍA	19
2.3 CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA	20
2.4 CONDICIONES DE REACCIÓN	20
2.5 DETERMINACIÓN DE H_2O_2 RESIDUAL	22
2.6 EVALUACIÓN DEL EFECTO CATALÍTICO DE LA ENZIMA	23
2.7 DETERMINACIÓN DE DQO	23

2.8 EVALUACIÓN DEL EFECTO COAGULANTE	24
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE PEROXIDASA	25
3.2 EFECTO DE PEROXIDASA DE RÁBANO Y H ₂ O ₂ SOBRE LA DQO	28
3.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO COAGULANTE	30
3.4 COMPARACIÓN DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS	32
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES	33
ANEXO	
I.- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-CCA-005-ECOL/1993	34
CAPÍTULO 5. BIBLIOGRAFÍA	36

2.1 EVALUACIÓN DEL EFECTO COAGULANTE	24
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE PEROXIDASA	25
3.2 EFECTO DE PEROXIDASA DE RÁBANO Y H_2O_2 SOBRE LA DQO	28
3.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO COAGULANTE	30
3.4 COMPARACIÓN DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS	32
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES	33
ANEXO	
1.- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-CCA-005-ECOL/1993	34
CAPÍTULO 5. BIBLIOGRAFÍA	36

Lista de Tablas

	Página
<i>Tabla 1.</i> Contaminantes de interés en el tratamiento de aguas	4
<i>Tabla 2.</i> Sustancias empleadas como agentes coagulantes en el tratamiento de aguas	8
<i>Tabla 3.</i> Métodos de tratamiento	12
<i>Tabla 4.</i> Proporción de reactivos	22
<i>Tabla 5.</i> Adición de reactivos	23
<i>Tabla 6.</i> % de H ₂ O ₂ remanente	27
<i>Tabla 7.</i> Disminución de DQO con respecto a la concentración de enzima (*)	28
<i>Tabla 8.</i> Efecto de la adición de un coagulante en la DQO	30
<i>Tabla 9.</i> Tabla comparativa	31

Lista de Figuras

<i>Figura 1.</i> Proceso de floculación	9
<i>Figura 2.</i> Polimerización de fenol	18
<i>Figura 3.</i> Consumo de peróxido en función de la concentración de enzima	26
<i>Figura 4.</i> Efecto de la concentración de peroxidasa en la DQO	29
<i>Figura 5.</i> Efecto del coagulante en la DQO	31

RESUMEN

La peroxidasa de rábano es una enzima oxidoreductasa (EC 1. 11. 1. 7), la cual posee especificidad por varios sustratos y cataliza la oxidación de fenoles y aminas aromáticas con peróxido de hidrógeno como último aceptor de electrones; dicha enzima también cataliza la polimerización de compuestos aromáticos en solución acuosa. El polímero resultante forma agregados insolubles que son removidos fácilmente por sedimentación o filtración.

Se evaluó la actividad de peroxidasa en muestras de agua residual procedentes de Celanese Mexicana planta Querétaro que produce fibras sintéticas, con objeto de remover en más de un 50% el contenido de materia orgánica, logrando con ello, una disminución en la Demanda Química de Oxígeno (DQO). Una filtración simple como la que se efectuó en el trabajo experimental no permitió la disminución de la DQO por arriba de 50%; debido a que la mayor parte de la materia orgánica en la muestra se encuentra en forma coloidal.

Debido a que la oxidación enzimática implica el uso de peróxido de hidrogeno como agente oxidante, se requirió tratar las muestras únicamente con este, a fin de tener un parámetro de comparación al tratamiento con enzima.

La oxidación de la muestra con H_2O_2 60 mM provoca una disminución de un 55.1% de la DQO. Mientras que cuando la muestra es tratada con peroxidasa de rábano y H_2O_2 60 mM se disminuye en 72.9%.

Siendo la enzima una proteína, en solución acuosa sus residuos de aminoácidos tendrán una carga dependiendo del pH al que se encuentre la solución. Por lo tanto, pueden interactuar con la materia que se halle en solución y que posea carga, con la posibilidad de presentar un efecto coagulante. Para comprobar lo anterior se evaluó el efecto que tenía únicamente la adición de enzima; comparando con el efecto de otros coagulantes como el cloruro de hierro III, alginato de sodio (polielectrolito aniónico), además del que pudiera presentar otra proteína inerte como es albúmina de suero bovina.

Al evaluar la eficiencia de los tratamientos (medida como disminución de DQO) se encontró que albúmina de suero bovina (a una concentración final de $0.7894 \mu\text{g/ml}$) puede lograr una remoción mayor que alginato de sodio (a la misma concentración) aunque menor a la removida con peroxidasa de rábano.

INTRODUCCIÓN

Al utilizar agua en procesos industriales, se le incorporan diversas sustancias en forma suspendida, coloidal o disuelta que degradan su calidad o pureza. Un agua contaminada necesariamente tendrá restricciones en cuanto a sus posibles usos y sitios de descarga, pudiendo provocar cambios importantes en el equilibrio ecológico del cuerpo receptor.

Para el tratamiento de aguas residuales o contaminadas existen diversos procesos y operaciones unitarios que, con una adecuada selección y combinación, pueden resolver la mayoría de los casos. En términos generales, existen procesos fisicoquímicos y procesos biológicos.

Un entendimiento de la naturaleza fisicoquímica del agua residual es esencial para el diseño y operación de sistemas de coleccion, tratamiento e instalaciones de disposición para el agua residual, y en el manejo ingenieril de la calidad ambiental.

Las aguas residuales pueden dividirse en dos clases: aguas residuales municipales o domésticas, provenientes principalmente de las actividades humanas cotidianas, y aguas residuales industriales.

Las descargas industriales contienen residuos de materias primas, intermedarios y productos finales producidos en la operación de la planta. Son de composición variable dependiendo del tipo de la industria y lo que esta produce. Según el tipo de industria, podemos clasificarlas como aguas residuales de la industria alimentaria, metal minera, química, petroquímica, papelería, etc.

Para cada industria existen condiciones particulares de descarga que deberan cumplirse despues de algún tipo de tratamiento. Estas son establecidas por la Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca.

En general las aguas residuales municipales y aquellas que provienen de industrias cuyos desechos son biodegradables son tratadas eficientemente por metodos biológicos

Dentro de la industria química existen desechos cuya composición química es de baja biodegradabilidad o bien su degradabilidad es muy lenta. Tal es el caso de aguas que contienen fenoles o aminas u otros compuestos tóxicos similares. Algunas aminas aromáticas son cancerígenas, y por ello su presencia es indeseable en las aguas que descarga la industria que las genera. Por lo tanto, el desarrollo de una propuesta tecnológica para la remoción de compuestos aromáticos a partir de aguas residuales es importante.

Tomando en cuenta que en muchas ocasiones se desea remover ciertos componentes particulares, es necesario entonces aplicar técnicas de tratamiento específicas para cada caso.

Para la remoción de aminas y fenoles aromáticos aparte de los métodos existentes (extracción con solventes, degradación microbiana, oxidación química y adsorción con carbón activado), grupos de investigadores han probado el uso de la enzima peroxidasa de rábano.

Lignina-peroxidasa ha sido probada para la remoción del color de los efluentes de papeleras que emplean el proceso Kraft (Ferrer, *l et al*, 1991).

Además de peroxidasa de rábano, la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* presenta actividad semejante y es capaz de efectuar la remoción de compuestos aromáticos (Pickard M. A. Kadima, 1991).

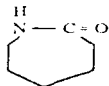
El tratamiento enzimático posee ventajas sobre los métodos convencionales como son: extracción con solventes, degradación microbiana, oxidación química y adsorción con carbón activado. Estas ventajas son: especificidad para un amplio número de sustratos, efectivo en un rango razonable de pH, temperatura y concentración, además de operar bajo condiciones suaves de reacción menos corrosivas, y en un tiempo de reacción más corto.

La planta de Celanese Mexicana ubicada en Querétaro produce fibras sintéticas del tipo nylon. El efluente de esta planta se compone en su mayor parte de monómeros, trimeros, y oligómeros pequeños que se encuentran fundamentalmente en estado coloidal y en solución (se desconoce la caracterización química completa de dicho efluente debido a la secrecía con que la planta maneja esta información)*. Aunque las descargas se tratan actualmente por métodos biológicos es bien sabido que los procesos biológicos deben manipularse con mucho cuidado para que el proceso sea eficaz; en el presente trabajo se ha evaluado la participación de peroxidasa de rábano para la remoción de materia orgánica considerando que un tratamiento enzimático podría tener ventajas sobre los tratamientos microbiológicos, o trabajar en forma complementaria a éstos.

* Nylon: poliamidas, término genérico usado para describir "fibras constituidas por largas cadenas conteniendo grupos amida (-CONH-). Algunos ejemplos son:

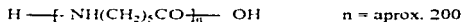
a) Nylon 6 (conocido como caprolan, mirlon, perlon, entre otros). Polímero lineal obtenido por polimerización de ϵ -caprolactama. Soluble en fenol, cresol, y otros ácidos fuertes e insoluble en la mayoría de solventes orgánicos.

Caprolactama es la materia principal:

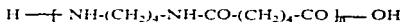


Caprolactama es soluble en agua, metanol, etanol, éter, tetrahidrofurano, ciclohexeno, hidrocarburos clorados, ciclohexeno y fracciones de petróleo.

Nylon 6



b) Nylon 46: preparado a partir de 1,4- diaminobutano y ácido adípico. soluble en ácido fórmico, poco soluble en ácido trifluoroacético.



CAPÍTULO I

GENERALIDADES

1.1 CARACTERÍSTICAS DE UN AGUA RESIDUAL

El agua residual es caracterizada en términos de su composición física, química y biológica. Los contaminantes importantes que requieren de un tratamiento se mencionan a continuación:

En la Tabla 1 se señalan los contaminantes de interés en el tratamiento de aguas residuales.

Tabla 1. Contaminantes de interés en el tratamiento de aguas

Contaminantes	Razón de importancia
Sólidos suspendidos	Pueden conducir al desarrollo de depósitos de lodos y a condiciones anaeróbicas cuando el agua residual es descargada en un ambiente acuático.
Orgánicos biodegradables	Compuestos principalmente de proteínas, carbohidratos y grasas. Si el agua residual es descargada sin tratar al ambiente, su estabilización biológica puede conducir al agotamiento de las fuentes naturales de oxígeno y al desarrollo de condiciones sépticas.
Patógenos	Algunas enfermedades pueden ser transmitidas por organismos patógenos presentes en el agua residual.
Nutrientes	Nitrógeno, fósforo y carbon son esenciales para la vida. Cuando son descargados a una fuente acuática natural pueden conducir al desarrollo de vida acuática indeseable, o si son descargados en cantidades excesivas al suelo, pueden conducir a la contaminación de pozos de agua.
Contaminantes peligrosos	Compuestos orgánicos e inorgánicos que son seleccionados con base en el conocimiento o sospecha de su carcinogenicidad, mutagenicidad, teratogenicidad o su alta toxicidad.
Orgánicos bioinfractarios	Tienden a resistir los métodos convencionales de tratamiento de aguas. Incluyen surfactantes, fenoles y pesticidas agrícolas.
Metales pesados	Deben ser removidos del agua.
Inorgánicos disueltos	Como calcio, magnesio, sodio, sulfatos y carbonatos tienen que ser removidos si el agua va a reusarse para reducir incrustaciones o corrosión en metales.

1.1.1 Características físicas

La característica más importante del agua residual es su contenido de sólidos totales, los cuales están compuestos de sólidos flotantes, sedimentables (o centrifugables), materia coloidal y materia en solución; otras características son el olor, temperatura, densidad, color, turbidez y pH.

Los sólidos totales se dividen en no filtrables (suspendidos) y sólidos filtrables. La fracción de los sólidos filtrables consta de materia coloidal y sólidos disueltos. La fracción coloidal esta integrada por partículas que van de 0.001 a $1\mu\text{m}$. Los sólidos disueltos constan de moléculas orgánicas e inorgánicas además de iones que están presentes formando una solución verdadera en el agua.

La fracción coloidal no puede ser removida por sedimentación. Generalmente es por oxidación biológica o coagulación, seguida de sedimentación.

1.1.2 Características químicas

1.1.2.1 Materia orgánica

Los compuestos orgánicos disueltos en agua se dividen en dos categorías generales: biodegradables y no biodegradables.

Materia biodegradable

Compuestos orgánicos que pueden ser utilizados como nutrientes por los microorganismos bajo condiciones adecuadas en un intervalo de tiempo relativamente corto.

Las poblaciones microbianas llevan a cabo la utilización de compuestos orgánicos disueltos mediante uno de los dos siguientes procesos:

- a. Oxidación. Adición de oxígeno a la solución acuosa que contiene la molécula orgánica para ser biotransformada por los microorganismos.
- b. Reducción. Sustracción de oxígeno presente en los compuestos orgánicos.

1.1.2.2 Materia no biodegradable

Aquellas sustancias que por sus características químicas son resistentes al tratamiento biológico, o bien su degradación es muy lenta; descargas industriales específicas pueden ser consideradas no biodegradables por ser tóxicas a los microorganismos.

1.1.2.3 Contenido de la materia orgánica

a. DBO (Demanda Bioquímica de Oxígeno)

La cantidad de oxígeno consumida durante reacciones metabólicas responsables del tratamiento biológico de las aguas residuales, es una medida de la cantidad de materia orgánica susceptible de ser eliminada por los microorganismos. Dicho valor es representado por la Demanda Bioquímica de Oxígeno, (DBO). Cuando este parámetro incluye el subíndice 5, implica el oxígeno consumido a lo largo de 5 días de incubación.

b. DQO (Demanda Química de Oxígeno)

Corresponde a la cantidad de materia orgánica susceptible de oxidación en un medio ácido; incluye la oxidación de la parte biodegradable medida por la DBO y además aquella materia orgánica resistente que se considera no biodegradable.

1.1.2.4 Alcalinidad / pH

Los bicarbonatos (HCO_3^-), carbonatos (CO_3^{2-}) e hidróxidos representan las principales formas de alcalinidad.

La concentración del ion hidrógeno, medido por el pH, es un importante parámetro de calidad de aguas residuales. El rango requerido para la existencia de la mayoría de los organismos biológicos es demasiado limitado. Aguas residuales que se descarguen con un pH extremo pueden acarrear problemas al tratamiento por medios biológicos. El pH de las aguas residuales, en algunas descargas requiere de un ajuste adecuado antes de entrar al tratamiento o de descargarse a cuerpos de agua receptores.

1.2 MÉTODOS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

Deben fijarse los objetivos del tratamiento a fin de que se cumpla con las regulaciones federales para el vertido (ver normatividad en el anexo) de aguas residuales a cuerpos receptores. El grado de tratamiento puede ser determinado al comparar las características del influente del agua residual con las que se requieren en el efluente una vez tratado.

Los contaminantes de un agua residual son removidos por medios físicos, químicos y biológicos. Los métodos individuales son clasificados como operaciones unitarias físicas, químicas y biológicas.

1.2.1 Operaciones físicas

Son aquellas en las que no ocurre una modificación química de los compuestos presentes. Estas son: tamizado, floculación, sedimentación, flotación, filtración, adsorción, etc.

1.2.1.1 Operaciones comúnmente empleadas

a. Filtración

Método para la separación de partículas sólidas de un fluido mediante el uso de un medio poroso. La fuerza motriz en la filtración es un gradiente de presión causada por la gravedad, la fuerza centrífuga, vacío o una presión más alta que la atmosférica. Remueve residuos finos de sólidos suspendidos remanentes antes o después de un tratamiento químico o biológico.

b. Sedimentación

Consiste en la separación de partículas suspendidas en el agua, gracias a la fuerza gravitacional y de acuerdo con la Ley de Stokes; sedimentan aquellas partículas que son más densas que el agua.

1.2.2 Operaciones químicas

La remoción o conversión de contaminantes resulta de reacciones químicas promovidas por la adición de sustancias químicas, o bien condiciones que las favorecen .

1.2.2.1 Precipitación Química

Proceso por el cual una sustancia es convertida a su forma insoluble ya sea por una reacción química o por cambios en la composición del solvente al disminuir la solubilidad de la sustancia en éste. El precipitado puede ser removido por sedimentación, filtración o flotación. En algunos casos la alteración es suave y la remoción se efectúa por atrapamiento dentro de un precipitado voluminoso, consistiendo primordialmente en una coagulación.

La desestabilización de cargas de los coloides es conocida como coagulación. La agregación de los coloides en partículas con una dimensión de varios milímetros se llaman "flocs" y el mecanismo de formación de tales flocs es conocido como floculación.

Por precipitación química se remueve cerca del 80-90% del total de materia suspendida, 40-70% de la DBO_5 , 30-60% de DQO y del 80-90% de bacterias; en comparación, únicamente 50-70% del total de materia suspendida y 30-40% de material orgánico se remueven por sedimentación simple.

En algunas ocasiones es necesario ajustar el pH a fin de incrementar el efecto del coagulante; además es necesario un alto grado de agitación para promover la dispersión del agente coagulante y su interacción con partículas coloidales.

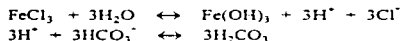
Sustancias químicas usadas como coagulantes en el tratamiento de aguas se mencionan en la Tabla 2.

Tabla 2. Sustancias empleadas como coagulantes en el tratamiento de aguas.

Sustancia	Dosis promedio	pH
Al ₂ (SO ₄) ₃	15-20 g/m ³	6-6.5
FeSO ₄	5-85 g/m ³	9
FeCl ₃	5-160g/m ³	4-6 y <8
Ca(OH) ₂ (cal) poliméricas: almidones celulosa alginatos polivinilpiridina		

Aspectos teóricos de la precipitación química

Un ejemplo de la acción que estas sustancias tienen en el agua es el siguiente:



El ion floculante Cl⁻, neutraliza las cargas positivas de la materia coloidal desestabilizando las cargas que mantienen a la materia en solución. Estas se agregan en partículas de mayor tamaño hasta que precipitan. Además de reacciones de este tipo, se llevan a cabo un gran número de reacciones dependiendo de las sustancias presentes en el agua.

Naturaleza de las partículas en el agua:

Hay dos tipos de partículas coloidales: hidrofílicas e hidrofóbicas. Sustancias químicas como gotas de aceite, burbujas de gas u otras sustancias inertes dispersas en el agua adquieren una carga negativa a través de la adsorción de aniones (particularmente iones hidroxilo -OH). En el caso de sustancias como proteínas o microorganismos, la carga superficial esta dada por la ionización de grupos amino y carboxilo. Donde a pH alto estaria NH₂CH(R)COO⁻, o a pH bajo NH₃⁺CH(R)COOH y en el punto isoelectrico NH₃⁺CH(R)COO⁻. La carga superficial en partículas isomorfas es adquirida por reemplazamiento de iones, tal es el caso de la arcilla u otras partículas sólidas en las cuales los iones están entrelazados en la estructura y son reemplazados con otros iones presentes en la solución. (por ejemplo: el reemplazo de Si con Al).

La acción de sustancias poliméricas empleadas como coagulantes:

Los polielectrolitos (moléculas poliméricas) se dividen en dos grupos: naturales y sintéticos. Entre los naturales se encuentran, polímeros de origen biológico como el almidón, alginatos y derivados de celulosa; entre los sintéticos es común el empleo de polivinilpiridina.

Dependiendo de su carga en el agua, los polímeros son aniónicos, catiónicos y noiónicos (neutros). Su acción se divide en tres categorías; en la primera, los polielectrolitos actúan como coagulantes que modifican la carga de las partículas del agua residual. Puesto que las partículas en el agua normalmente están cargadas negativamente, se emplean polielectrolitos positivos como polivinilpiridina; estos se consideran coagulantes primarios.

El segundo modo de acción es estableciendo un puente entre partículas como se muestra en Figura 1.

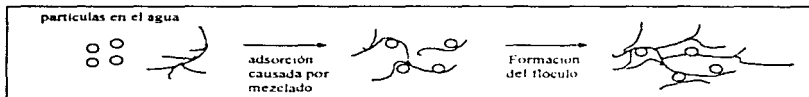


Figura 1. Proceso de floculación

Los polímeros que son aniónicos o noiónicos son atacados por las partículas presentes en el agua y éstas quedan adheridas al polímero por medio de puentes. Durante la floculación las partículas así unidas se entrelazan por medio de otro puente a otras partículas. El tamaño de la partícula crece hasta que puede ser removida fácilmente por sedimentación.

El tercer modo de acción es también coagulación, que resulta de usar polielectrolitos catiónicos de muy alto peso molecular. Además de disminuir la carga, estos polielectrolitos forman un gran número de puentes.

1.2.2.2 Oxidación y Reducción

Son aquellas reacciones en las que el estado de oxidación de alguno de los reactivos es incrementado y la oxidación de otro reactivo es disminuido.

La oxido-reducción tiene importancia en el tratamiento de aguas que contienen residuos inorgánicos tóxicos como metales, sulfuros, cianuros y cromo; así como en el tratamiento de desechos de fenoles, pesticidas y compuestos con azufre. Debido a que la presencia de algunos de estos residuos puede inhibir el desarrollo de microorganismos y por lo tanto no pueden tratarse biológicamente. Algunos son compuestos bioinfractarios.

1.2.2.2.1 Oxidación

Ampliamente usada al tratar todo tipo de desechos. La tecnología está bien establecida y representa un medio seguro de tratamiento de aguas; es fácilmente monitoreado y controlado.

Puesto que los agentes oxidantes tienden a no ser selectivos y representan una proporción grande del costo del tratamiento, este tipo de tratamiento es más usado para tratar desechos con un contenido bajo de sustancias orgánicas.

Desechos orgánicos que han sido tratados por oxidación química incluyen fenoles, aminas, mercaptanos y clorofenoles. Sin embargo algunos orgánicos son resistentes a la oxidación por agentes químicos a temperatura ambiente y presión atmosférica; por lo tanto requieren de temperaturas más elevadas y uso de catalizador o de luz ultravioleta.

Agentes oxidantes

Estos varían en su potencial de oxidación, conveniencia, costo y generación de subproductos. Por ello, para cada aplicación se requiere de una cuidadosa consideración, a menudo con una evaluación a escala antes de seleccionar el agente oxidante y el equipo para la aplicación industrial.

- Cloro gas: es el más usado por su bajo costo. Presenta riesgos en su manejo (por ser gas) y puede generar subproductos organoclorados cancerígenos.

- Hipoclorito de sodio: posiblemente el más ampliamente usado. Disponible en solución acuosa; fácilmente se transporta, almacena y se introduce al sistema de reacción.

- Compuestos bromados.

- Peróxido de hidrógeno: casi todas las aplicaciones industriales de peróxido son a concentraciones de 35-70% en peso. Ha sido usado para la oxidación de aguas residuales conteniendo fenol y efluentes de fabricas de papel, lodos de perforación y otro tipo de aguas residuales con sustancias orgánicas. Soluciones de altas concentraciones requieren de precauciones de seguridad especiales, en el manejo y almacenamiento. Es un oxidante relativamente seguro.

- Ozono: el tratamiento con ozono se conoce también como Ozonización. Es un método relativamente caro, más es ampliamente usado en el tratamiento de aguas para beber. Sin embargo aunque es un potente oxidante, hay un número de sustancias que son poco oxidadas. La oxidación de algunos de estos puede ser aumentada con luz ultravioleta. Por ejemplo, complejos de cianuro de fierro y soluciones de bifenilos policlorados son destruidos rápidamente con luz UV-ozono. Este tipo de sistemas ha sido usado para solventes halogenados tales como cloruro de metileno, tricloroetileno, tetracloruro de carbono y cloruro de vinilo (Harry, 1989).

Potencial de uso en el tratamiento de residuos

La oxidación y reducción química son comúnmente utilizadas y su uso se está extendiendo a medida que las regulaciones son más estrictas, y se requiere completar la remoción de contaminantes.

En general los altos costos de tratamiento son altamente influenciados por el costo del oxidante; por eso la oxidación tiende a ser más adecuada para bajas concentraciones (menos de 1%) en residuos. Se espera que esta restricción continúe; aunque a medida que aumenta la necesidad de tratar el agua de manera más eficiente, su aplicación seguramente se extenderá en el futuro.

1.2.3 Operaciones biológicas

Son usadas principalmente para remover sustancias orgánicas biodegradables (coloidales o disueltas); estas se eliminan del agua en forma de nuevas células o de gases que pueden escapar a la atmósfera y los microorganismos son removidos por sedimentación. Estos tratamientos también son usados para remover nutrientes (nitrógeno y fósforo) del agua.

El tiempo necesario para una efectiva acción de los microorganismos dependerá de la cantidad y tipo de contaminantes que entran por unidad de tiempo, además de la calidad requerida del efluente. Hay también sistemas naturales en los que se utiliza un medio natural (suelo, laguna con plantas, etc.) para llevar a cabo el tratamiento; en general, este tipo de procesos requiere de grandes extensiones de terreno.

Por aspectos técnicos y económicos, los procesos fisicoquímicos se aplican en el tratamiento de aguas conteniendo contaminantes inorgánicos, materia orgánica no biodegradable o compuestos tóxicos para los microorganismos. Por su parte los procesos biológicos se emplean cuando los principales contaminantes son orgánicos biodegradables, así como algunos aniones inorgánicos (nitratos, nitritos, sulfatos, fosfatos). En esas condiciones, las aguas residuales municipales, así como una gran variedad de desechos líquidos industriales pueden ser tratados por vía biológica.

PROCESOS Y OPERACIONES UNITARIOS PARA LA REMOCIÓN DE DIVERSOS TIPOS DE CONTAMINANTES EN AGUAS RESIDUALES

En la Tabla 3 se muestran los métodos más convenientes según el tipo de contaminantes.

Tabla 3. Métodos de tratamiento

Contaminante	Proceso
Materia orgánica + biodegradable	<ul style="list-style-type: none"> • procesos biológicos • procesos fisicoquímicos • filtración lenta • sistemas naturales
Materia orgánica + en general	<ul style="list-style-type: none"> • adsorción • ozonización (oxidación) • sistemas naturales
Sólidos suspendidos	<ul style="list-style-type: none"> • tamizado, trituración • desarenación • sedimentación • filtración • flotación • coagulación-sedimentación • sistemas naturales
Compuestos tóxicos + metales pesados	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación química • Intercambio iónico • sistemas naturales
Compuestos tóxicos + orgánicos volátiles	<ul style="list-style-type: none"> • desorción con aire • adsorción
Compuestos tóxicos + orgánicos prioritarios	<ul style="list-style-type: none"> • (ver materia orgánica en general)
Color y turbiedad	<ul style="list-style-type: none"> • coagulación-sedimentación • filtración • oxidación química • adsorción • sistemas naturales

1.3 TRATAMIENTO ENZIMATICO

Diversas sustancias químicas son difícilmente removidas por tratamientos convencionales o su remoción significa grandes inversiones; por lo tanto como una propuesta biotecnológica se ha planteado el tratamiento con enzimas que al presentar diversas ventajas sobre los tratamientos convencionales, puede convertirse en una opción muy interesante.

En los tratamientos biológicos donde la degradación de la materia es gracias a microorganismos, las entidades químicas responsables de la transformación de las sustancias son enzimas producidas por los microorganismos. Las enzimas son estructuras de naturaleza proteica y llevan a cabo funciones catalíticas en seres vivos y por ende juegan un papel esencial en todos los procesos vivientes. Poseen características de cualquier catalizador, incluidas su demarcación por las leyes termodinámicas y su caracterización a través de modelos cinéticos. Desde luego, resultaría práctico trabajar solamente con las enzimas, pues resultaría en un sistema de fácil control.

La polimerización de compuestos aromáticos en presencia de enzimas oxidoreductoras recientemente ha sido del foco de mucha atención, debido a su uso potencial en la depuración de aguas industriales. En particular la peroxidasa de rábano ha demostrado habilidad para catalizar la polimerización de compuestos aromáticos; el polímero resultante forma agregados insolubles que son fácilmente removidos por sedimentación o filtración.

Además, hay casos en que el precipitado producido enzimáticamente puede ser recuperado para usarlo como un combustible (Klibanov et al, 1983).

Considerando que un sistema de tratamiento pretende remover la materia indeseable, en principio por la disminución de su carácter tóxico o volviéndola más susceptible a ser degradada biológicamente, o bien ser quitada de la solución propiamente, las enzimas pueden por sí solas contribuir a lograr estos objetivos.

Posibles usos

El tratamiento enzimático puede ser usado en conjunción con los métodos convencionales, como un tratamiento primario, en el cual, al reducir la cantidad de materia orgánica a tratar, se reduce la cantidad de lodos formados durante el tratamiento biológico o bien como un tratamiento terciario al tratar compuestos biorefractarios.

Estos procesos pueden ser aplicables en el tratamiento de agua para beber con objeto de remover contaminantes orgánicos aromáticos (Maloney, 1984).

1.3.1 Enzimas empleadas en tratamiento de efluentes

Casi todas son de la clasificación de oxido-reductasas.

1.3.1.1 Cloroperoxidasa

La enzima cloroperoxidasa puede llevar a cabo un amplio número de reacciones basadas en su actividad de halogenación y la que presenta como peroxidasa. Se ha demostrado que cloroperoxidasa obtenida del hongo imperfecto *Caldariomyces fumago* puede llevar a cabo la oxidación de una variedad de fenoles sustituidos a concentraciones arriba de 0.1% del compuesto. Bajo condiciones no optimizadas, del 50-90% de los compuestos fenólicos fueron oxidados y solamente la mitad de las reacciones formaron productos insolubles fácilmente removidos de la solución. Así, cloroperoxidasa puede proveer una alternativa al uso propuesto de peroxidasa de rábano para la remoción de compuestos fenólicos de soluciones acuosas (Carmichael, *et al.*, 1985).

1.3.1.2 Lignina peroxidasa

Lignina-peroxidasa ha demostrado tener un considerable potencial para el tratamiento de efluentes de papel tipo Kraft en la remoción del color (Ferrer, *et al.*, 1991).

1.3.1.3 Lacasa (Bencenediol: oxígeno oxido-reductasa)

Enzimas secretadas por el hongo *Trametes (Coriolus) versicolor* pueden oxidar, polimerizar y bajo algunas condiciones descomponen una variedad de compuestos fenólicos biológicos o sintéticos. Esta enzima ha sido probada en efluentes de blanqueado de papel kraft y se ha mostrado que pueden remover rápidamente el cloro de compuestos clorofenólicos.

1.3.1.4 Peroxidasa de rábano

Trabajos anteriores como los efectuados por Klibanov *et al.* (1981) y Nakamoto *et al.* (1992), entre otros, han demostrado que el uso de peroxidasa remueve fenoles y aminas aromáticas presentes en aguas industriales.

En 1985 Klibanov empleó exitosamente peroxidasa de rábano en la polimerización de fenol en un efluente de conversión de carbón conteniendo fenol, amoníaco, cloruros, cianuros, tiocianatos y otros constituyentes que afectan adversamente a las bacterias y otros métodos de defenolización; demostró que el tratamiento era efectivo en un amplio rango de pH y temperatura, así como a diversas concentraciones de fenol. Se logró remover de 97 a 99 % a de fenol, lo que significa que el agua residual puede ser tratada sin acondicionamiento previo.

Además otros contaminantes como bifenilos policlorados, naftaleno y azobenceno, los cuales no son propiamente sustrato de la enzima, son removidos al ser coprecipitados con los fenoles y anilinas que si son sustrato.

Al evaluar el efecto de la temperatura, Nicell *et al.* (1992) mostro que la peroxidasa de rábano es susceptible a una inactivación rápida a temperaturas mayores de 45°C. El pH óptimo

dependerá del sustrato a tratar, pero en términos generales está en un rango de 6-9. Nicell probó con fenol, 3-clorofenol y 4-metilfenol a concentraciones de enzima de 0.0295 U/ml. Además encontró que la mayor actividad catalítica con fenol es a concentraciones menores a 0.2 U/ml de enzima.

Recientemente se ha desarrollado un método para remover fenoles del agua residual mediante tratamiento con peroxidasa y un coagulante polimérico catiónico (Tatsuni K *et al.*, 1994). El precipitado (coagulante) producto de la actividad enzimática sobre el fenol, reduce la inactivación de peroxidasa causada por los productos de reacción del fenol con la enzima. Esta estabilización de peroxidasa disminuye la cantidad de enzima requerida para la remoción de fenol. La reacción del coagulante con los productos a partir del fenol resultan en un gran precipitado removible con una simple filtración o sedimentación.

Los clorofenoles son clasificados como sustancias químicas peligrosas. Una de las fuentes de este tipo de reactivos son los efluentes de blanqueo de pulpa de papel. Aunque estos son tratados con métodos biológicos y químicos, el método enzimático presenta la ventaja de ser capaz de operar en un amplio rango de concentración del contaminante con un corto tiempo de residencia.

Por otra parte, se han hecho pruebas con peroxidasa sobre sustratos policlorados teniéndose buenos resultados para 2-diclorofenol con una eficiencia en la remoción de 75-90% a concentraciones de 100mg l del sustrato (Maloney, *et al.* 1986).

1.3.2 Ventajas y desventajas del tratamiento enzimático

En el caso del fenol, el tratamiento enzimático, presenta algunas ventajas sobre los tratamientos convencionales (extracción por solventes, degradación microbiana, oxidación química y adsorción con carbón activado) como son: especificidad para una variedad de sustratos, efectividad en un rango razonable de pH, temperatura y concentración de fenol. No obstante, la principal desventaja es que se requiere una gran cantidad de enzima para lograr una alta eficiencia en la remoción debido a la desactivación aparente que la enzima presenta, ya que moléculas de peroxidasa son adsorbidas por el polímero resultante y de este modo hay menor cantidad de enzima disponible para actuar con las moléculas de sustrato (Nakamoto and Machida, 1992). Esto, aunado a la pérdida de la enzima durante el tratamiento, ya que es irrecuperable, limita su aplicación en la industria.

Por ello, se han probado diversos sistemas que buscan prolongar la vida útil de la enzima. Se ha visto que a bajas concentraciones de enzima la inactivación de ésta se reduce, una manera de conseguir esto es mediante un sistema de adición continua (Nicell *et al.* 1992 y 1993).

Otra forma ha sido la adición de aditivos como gelatina y polietilenglicol de diversos pesos moleculares, donde las interacciones de estos con el polímero formado compiten con las presentadas con la peroxidasa (Nakamoto and Machida, 1992). Existe una patente japonesa para la remoción de fenoles y aminas aromáticas a partir de aguas industriales con peroxidasa usando aditivos (Nakayama and Noriyuji, 1992).

Otra interesante opción es el uso de enzimas inmovilizadas. Peroxidasa se ha inmovilizado en una matriz de papel filtro de celulosa, partículas de nylon, o un tubo de nylon, probándose el sistema para 4-clorofenol (Siddique, *et al.*, 1993). Esto significa que puede emplearse una cantidad relativamente pequeña de enzima para tratar de manera continua algunos compuestos en solución acuosa.

La enzima presenta acción en presencia de algunas sustancias que son tóxicas para los microorganismos, y además de operar sobre un amplio rango de temperatura y pH lo hace también en un amplio rango de salinidad (fuerza iónica), (Nicell, *et al.*, 1992).

1.4 PEROXIDASA DE RÁBANO

Peroxidasa es ampliamente extendida en la naturaleza. Se encuentra en animales y plantas superiores como en el rábano, la pila, la papa, la savia de la higuera, en levaduras, hongos y bacterias. La forma más estudiada y con mayores ventajas ha sido la peroxidasa de rábano.

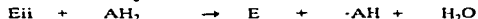
Peroxidasa (donador: H_2O_2 - oxidoreductasa, EC 1. 11. 1. 7), posee especificidad para varios sustratos y cataliza la deshidrogenación de compuestos aromáticos tales como fenoles, hidroquinonas y aminas hidroquinoides, especialmente derivados de benzidina. En particular, 2-cresol, 2-toluidina, guaiacol, pirogalol, ácido homovanilínico, hidroquinona, 1,2- y 1,4-fenilendiamina, benzidina, o-toluidina, di-o-anisidina, etc.

Es una hemoproteína, pertenece a la clase de ferri-(Fe^{III} -hemoproteínas) que colectivamente son llamadas "hidroperoxidadas"; el sustrato preferido por estas enzimas es peróxido de hidrógeno o alquilperóxido.

A pesar de que la reacción normal de peroxidasa consiste en la transferencia de un hidrógeno o electrones de un donador al H_2O_2 , hay algunos ejemplos de peroxidasa en que actúa como oxidasa ($SH_2 + O_2 \rightarrow S + H_2O_2$) o monooxigenasas ($S-H + O_2 + NADPH \rightarrow S-OH + NADP^+ + OH^-$); también es posible la introducción de un átomo de hidrógeno en una molécula o sustrato.

1.4.1 Ciclo catalítico de peroxidasa de rábano

La oxidación de un compuesto aromático (AH₂) por pérdida de un electrón catalizada por peroxidasa es bien entendida y es usualmente representada de la siguiente manera:



La enzima nativa es oxidada por peróxido a un intermediario enzimático activo llamado compuesto I (Ei). El estado de la enzima en el compuesto I aceptará una molécula del compuesto aromático dentro de su sitio activo y llevará cabo su oxidación. El resultado es un radical libre ($\cdot AH$), y es liberado a la solución dejando la enzima en un estado denominado compuesto II (Eii). Esta forma de la enzima oxidará a otra molécula del compuesto aromático, liberando un segundo radical libre al seno de la solución y regresando la enzima a su estado nativo. Así se completa el ciclo. Los radicales libres formados durante el ciclo difunden de la enzima a la solución, donde pueden combinarse y formar productos poliaromáticos.

No obstante, en exceso de H₂O₂ puede ocurrir la siguiente reacción:



Donde el compuesto III (Eiii) no es catalíticamente activo, pero su formación no representa la terminación de la inactivación de peroxidasa puesto que el compuesto III se descompone instantáneamente de acuerdo a la reacción propuesta por Arnau *et al* (1990).



Sin embargo el regreso a la forma nativa de la enzima es lo suficientemente lento que una vez en el compuesto III la forma de la enzima es severamente impedida para llevar a cabo la oxidación catalítica de aromáticos. En presencia de exceso de peróxido la formación del compuesto III aumentará la supresión catalítica. (Nicell, *et al*, 1992).

En las plantas, la peroxidasa participa en la biosíntesis poliaromática durante la cooxidación de fenoles y aminas, donde el peróxido es reducido y se generan radicales fenoxi, que son capaces de acoplarse o polimerizar en un producto polifenólico, la Figura 2 muestra el proceso.

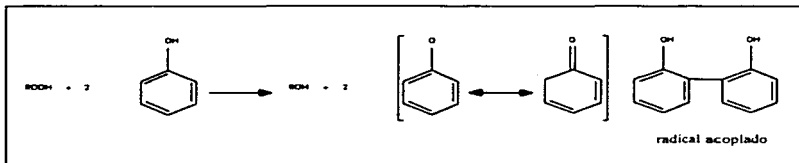


Figura 2. Polimerización de fenol.

Peroxidasa es inhibida por azida ($I_{50} = 9.8 \text{ mM}$) y por cianuro ($I_{50} = 646 \mu\text{M}$), donde I_{50} es la concentración necesaria del compuesto para alcanzar 1/2 de inhibición (Zollner, 1993). También es inhibida por el ácido *p*-aminobenzoico, L-cistina-dicromato, hidroxilamina, sulfitos y los iones metálicos Cd^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} y Ni^{2+} , citados por Guibault et. al. (1968).

1.5 OBJETIVOS

- ✦ Evaluar la eficiencia de peroxidasa de rábano en la remoción de compuestos orgánicos presentes en aguas procedentes de la industria química.
- ✦ Determinar las mejores condiciones de operación para lograr una remoción de sólidos totales con un 80-90% de eficiencia (como DQO del agua residual).
- ✦ Caracterizar el papel de la peroxidasa de rábano como ayuda de clarificación de los residuos modelo empleados.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Equipo y material:

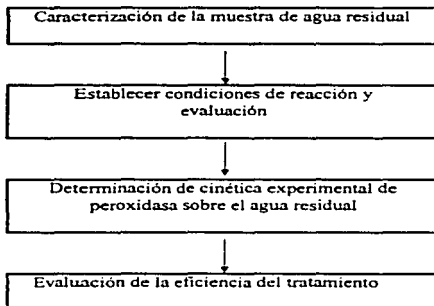
El equipo empleado fue el siguiente:

- Espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 2S, equipado con carrusel de celdas y temperatura controlada.
- Baño de temperatura controlada marca Heto.

El material utilizado en el trabajo experimental:

- Peroxidasa de rábano (HRP) tipo II adquirida de SIGMA Chemical Co. (St. Louis).
- Albúmina de suero bovina adquirida de SIGMA Chemical Co. (St. Louis).
- Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) -ABTS- de SIGMA Chemical Co. (St. Louis)
- Peróxido de Hidrógeno adquirido de J. T. BAKER (México).

2.2 Metodología:



2.3 Caracterización de la muestra

Una vez colectada la muestra de agua residual procedente de Celaya Mexicana, ésta fue conservada en un recipiente tapado, a 7°C, su color fue blanco, con olor intenso a solvente y una alta turbidez. Es difícil establecer la relación de la turbidez con la concentración de materia suspendida debido a que el tamaño, forma y el índice de refracción de las partículas afecta la dispersión de la luz. Por lo que, la medida de turbidez para muestras de un mismo lote no necesariamente dará el mismo valor. Además, la determinación de turbidez debe hacerse el mismo día que la muestra es colectada, pues con el paso del tiempo algunos componentes de la muestra llegan a sedimentar. De manera que para este caso la determinación de turbidez fue cualitativa, pues no se pretende determinar la concentración de la muestra, sino, solamente definir la presencia de materia en estado coloidal.

La toma de una muestra requiere de una buena agitación a fin de que todos los componentes de ésta se encuentren bien distribuidos. Para conocer la cantidad de materia presente en el agua se usarán determinaciones de DQO y/o DBO₅ (sección 1.1.2.3).

Se determinó demanda química de oxígeno a la muestra sin tratar, al igual que al sobrenadante. La DQO se empleó como método de calificación de la eficiencia de los tratamientos empleados.

2.4 Condiciones de reacción

a. Consideraciones

Se seleccionó una temperatura debajo de los 35°C dado que se promueve el proceso de polimerización (Nicell, *et al*, 1992).

Nicell *et al* (1993), considerando que la inactivación de peroxidasa en un reactor tipo batch se incrementa con la concentración de enzima (Nicell, *et al*, 1992) -ya que estas condiciones incrementan la probabilidad de que los radicales libres generados durante la oxidación regresen al sitio activo de la enzima, haciéndola inactiva- propusieron que, para reducir la proporción en la formación de esos radicales se disminuyera la concentración de peroxidasa mediante adicionar continuamente la enzima a la mezcla de reacción (H₂O₂ + fenol) durante cierto periodo de tiempo. Así se generarían menos radicales, además, habría una baja concentración de enzima disponible para ser inactivada. Realizaron el experimento a tiempo 0, 1, 3, 4 y 20 hr de reacción, a partir de una concentración inicial de 0.1 U/ml de peroxidasa, y durante el tiempo de reacción se realizaron adiciones variando el flujo hasta completar una concentración final de 1.2 U/ml. Se determinó el número de moléculas de sustrato precipitadas por molécula de enzima cuando se alcanzó la concentración de 0.1, 0.3, 0.6, 0.8, 1.0 y 1.2 U/ml de peroxidasa.

Los resultados obtenidos del experimento son

- El número de moléculas de sustrato que son precipitadas por molécula de enzima es mayor cuando la concentración de enzima en el reactor es menor a 0.4 U/ml.

- Sin embargo por arriba de 4hr de reacción dicha mejora se ve limitada por otros mecanismos de inactivación, (según el autor pueden ser: formación del compuesto III - ver sección 1.4.1- , atrapamiento de la enzima en los productos de precipitación).
- Se requiere de tiempos de reacción por arriba de 3hr para conseguir una remoción de fenol mayor al 80% a bajas concentraciones de enzima.
- No se observaron mejoras en la eficiencia de la remoción de fenol cuando H_2O_2 fue adicionado durante intervalos de tiempo.

Es por esto, que para el sistema empleado durante este trabajo se realizaron adiciones continuas de peroxidasa a la mezcla de reacción a fin de reducir la concentración de enzima para disminuir su inactivación.

Además, para llegar al diseño del experimento se tomaron en cuenta las siguientes observaciones:

- puesto que el agua presenta en su mayor parte materia en estado coloidal, en primer lugar se evaluó el efecto oxidativo del H_2O_2 sobre la muestra con el fin de desestabilizar el coloide, para que posteriormente sea sedimentado y removido mediante filtración. Para esto se efectuaron adiciones de 1ml de H_2O_2 0.01M cada 15 minutos a la mezcla de reacción mantenida en agitación hasta observar una separación de fases. Después 3hr de reacción y de haber adicionado 170 μ g/ml de peróxido a una muestra de 8ml se dejó sedimentar durante aproximadamente 4hr y no se observó cambio alguno. Entonces se probaron concentraciones entre 0.01- 0.1M, donde a concentraciones por arriba de 526 μ g/ml de H_2O_2 se presentó separación de fases después de la sedimentación. Sin embargo, no se sabía el efecto que tenía el H_2O_2 sobre los componentes de la muestra, por lo tanto, fue necesario obtener el espectro de absorción de la muestra a una longitud de onda de 200-300nm (UV) para cada una de las concentraciones probadas y se observó que a una concentración de H_2O_2 de 526 μ g/ml en adelante algunas áreas del espectro de absorción disminuían, indicando así que el H_2O_2 estaba oxidando a los compuestos del agua.

A fin de disminuir la cantidad de H_2O_2 necesaria para la desestabilización del coloide se probó adicionando además de H_2O_2 0.06M, enzima a diferentes concentraciones. Se observó que efectivamente la cantidad de H_2O_2 necesaria disminuía.

Hasta aquí no se estaba considerando el consumo de peróxido durante la reacción, para ello se trataron por duplicado muestras de agua residual de 8ml con H_2O_2 60mM adicionando el peróxido y la enzima (0.001 mg/ml) en alícuotas de 1, 0.5 y 0.25ml hasta adicionar 3ml respectivamente, el tiempo total de reacción fue de aproximadamente 4hr; utilizando la técnica señalada en la sección 2.5 se determinó el H_2O_2 residual. Los resultados mostraron que al adicionar alícuotas de 0.25ml de enzima y 0.25ml de H_2O_2 , el consumo de peróxido es mayor que si se adicionaban alícuotas de 0.5 y 1ml respectivamente. Por consiguiente se decidió hacer adiciones de 0.25ml tanto de H_2O_2 como de peroxidasa.

b. Condiciones

Peroxidasa de rábano se preparó en solución buffer de fosfatos a pH 6.0 ; peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a una concentración de 60mM en buffer pH 6.0 .

La reacción se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer cerrados a fin de evitar pérdida de componentes por evaporación, mantenidos en un baño de temperatura controlada a 31°C y agitación.

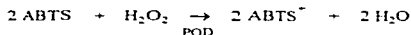
Se trataron lotes de 8ml de agua residual por duplicado, adicionando 0.25ml de H₂O₂ y 0.25ml de enzima a intervalos de 30 minutos; la reacción fue iniciada por la adición de peroxidasa al sistema de reacción; el tiempo total de reacción fue de 3 horas, tomando alícuotas cada 30 min para la cuantificación de peróxido de hidrógeno residual.

2.5 Determinación de H₂O₂ residual

Se midió el consumo de peróxido en función del tiempo con objeto de establecer la cinética de peroxidasa sobre el agua residual.

La determinación se efectúa mediante el método colorimétrico con 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS) y peroxidasa de rábano tipo II. La sustracción de un electrón da origen a un compuesto estable del ion ABTS^{•+}, cuya absorbancia es registrada a una longitud de onda (λ) 420nm (Pütter y Becker, 1983).

El principio del método es el siguiente:



POD: peroxidasa.

La estequiometría de la reacción es 2 mol de ABTS con un mol de peróxido. Si el peróxido es el reactivo limitante en poco tiempo se presenta el consumo total de peróxido. Mediante un cálculo sencillo de estequiometría se calcula la cantidad de peróxido remanente en el sistema de reacción y por ende la cantidad de peróxido consumido. Se registra la absorbancia a una longitud de onda (λ) 420nm hasta que no hay incremento en la absorbancia.

Para la determinación se tomaron alícuotas de 4μl de la mezcla de reacción y se adicionaron los siguientes reactivos como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Proporción de reactivos.

Celda	Buffer (ml)	Muestra (μl)	ABTS (μl)	Peroxidasa (ml)
blanco	2.388	4	8	0
1	1.388	4	8	1
2	1.388	4	8	1

2.6 Evaluación del efecto catalítico de la enzima

Se probaron seis diferentes concentraciones de peroxidasa de rábano por duplicado, bajo las condiciones antes mencionadas (2.4.b). Las adiciones de reactivos se efectuaron como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Adición de reactivos.

ml de enzima	ml de H_2O_2	t de adición (minutos)	Volumen total (ml)
0.25	0.25	0	8.5
0.25	0.25	30	9.0
0.25	0.25	60	9.5
0.25	0.25	90	10.0
0.25	0.25	150	10.5

Las concentraciones de peroxidasa probadas fueron: 0.003, 0.004, 0.005, 0.006, 0.01, 0.07mg/ml.

Puesto que el peróxido de hidrógeno es un oxidante, se trató una muestra de agua residual y una de agua destilada únicamente con H_2O_2 bajo las mismas condiciones. En ambos casos se tomaron alícuotas cada 30 minutos para determinar peróxido de hidrógeno residual. De este modo conocemos la cantidad de H_2O_2 que reacciona con los componentes de la muestra en ausencia de peroxidasa (muestra de agua residual + H_2O_2) y la cantidad de H_2O_2 que se pierde por descomposición (agua destilada + H_2O_2).

Una vez tratada la muestra se dejó sedimentar durante 24hr y se filtró a través de papel Wattman número 5 por filtración simple.

Al filtrado se le determinó demanda química de oxígeno, con objeto de conocer el porcentaje de remoción de materia orgánica (como DQO).

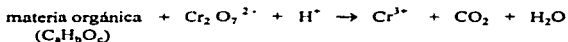
De este modo se determinó cual es la concentración de peroxidasa más conveniente para tratar la muestra y lograr una mayor remoción de la materia orgánica.

2.7 Determinación de DQO

Se empleó el método titulométrico de reflujo cerrado, basado en la oxidación de la materia orgánica por un oxidante químico fuerte (dicromato de potasio) en un medio ácido. La prueba se efectúa elevando la temperatura; la adición de un catalizador como sulfato de plata es necesario para ayudar a la oxidación de cierta clase de compuestos orgánicos.

La técnica seguida está descrita en Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 1989.

La reacción principal puede ser representada de modo general por la siguiente ecuación sin balancear:



Se titula el exceso del ion dicromato con una solución reductora de sulfato de fierro y amonio en presencia de ferroína (un indicador redox).

La DQO se reporta como miligramos de O₂ /l de agua.

Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

2.8 Evaluación del efecto coagulante

Fueron tratados por duplicado lotes de 8ml de muestra bajo las condiciones de temperatura y pH antes mencionadas; en esta prueba no se adicionó peróxido de hidrógeno sino únicamente enzima a concentraciones de 0.003, 0.005, 0.006, 0.01 y 0.07mg/ml. La adición de enzima se hizo una sola vez, al inicio de la reacción que duró un total de 3 horas.

Al finalizar la reacción, la muestra se dejó sedimentar alrededor de 15-20 minutos y se filtró a través de papel Wattman Núm. 5; al filtrado se le determinó DQO.

Se probaron también floculantes de uso común como el FeCl₃ a una dosis de 5g/l de agua a tratar, alginato de sodio (polímero aniónico) y albúmina de suero bovina a una concentración de 0.006mg/ml que corresponde a la concentración de enzima a la que se observó mayor porcentaje de remoción (disminución de DQO).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS y DISCUSIÓN

3.1 Evaluación de la actividad catalítica de peroxidasa

Con el fin de determinar si la enzima peroxidasa puede ser utilizada para el tratamiento de aguas residuales, - ya que favorece el consumo de H_2O_2 utilizado en la remoción de compuestos orgánicos - se evaluó la actividad catalítica de esta enzima a diferentes concentraciones. Para esto se midió la cantidad de peróxido residual en las muestras, lo cual es una medida indirecta de la remoción de compuestos orgánicos. Se adicionó a las muestras enzima peroxidasa a 6 diferentes concentraciones, manteniendo constante la concentración de H_2O_2 inicial. Paralelamente se corrió como testigo una muestra adicionando únicamente H_2O_2 a la misma concentración.

Por otra parte, debido a que el H_2O_2 se pierde por descomposición, su valor correspondiente fue determinado corriendo un blanco de agua destilada con peróxido; dicho valor fue restado de la cantidad de peróxido obtenida en los tratamientos mencionados anteriormente con el fin de conocer el consumo real de H_2O_2 en las muestras.

Se podría pensar que el consumo de H_2O_2 es directamente proporcional a la cantidad de materia orgánica removida, (resultando en una disminución de la demanda química de oxígeno DCO). Por eso, al aumentar la concentración de enzima se busca alcanzar el mayor consumo de H_2O_2 posible.

En la Figura 3 se muestra la cinética del consumo real de peróxido hasta un tiempo total de 150 min para 3 de las concentraciones de enzima ensayadas y para la muestra control tratada con H_2O_2 únicamente.

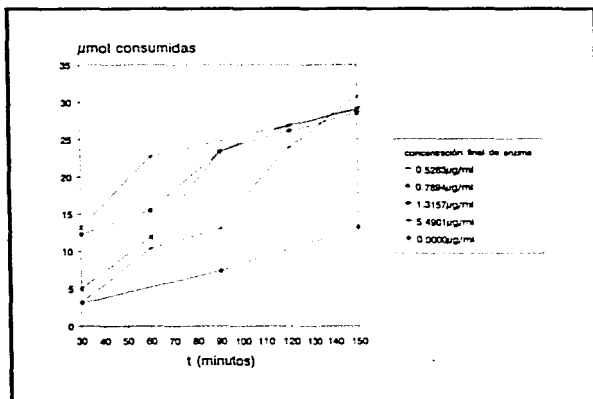


Figura 3. Consumo de peróxido en función de la concentración de enzima.

Se puede observar que con el aumento en la concentración de enzima se consiguen cambios en la pendiente ($\mu\text{mol } H_2O_2/\text{min}$ = velocidad de consumo) de las rectas, es decir hay cambios en la velocidad de consumo cuando varía la concentración de peroxidasa, se podría pensar que a medida que aumenta la concentración de peroxidasa debería aumentar el consumo de H_2O_2 hasta llegar a alcanzar la v máxima en la que sin importar la cantidad de enzima presente la velocidad ya no se vería afectada (o bien ya no aumentaría). Sin embargo, en el experimento realizado se observa una disminución en el valor de la velocidad cuyas causas podrían ser las siguientes: a la inactivación de la enzima por su inherente inestabilidad en las condiciones de reacción, a la inhibición por producto o al desplazamiento del equilibrio si la reacción es en algún grado reversible, de acuerdo a lo que reporta Illanes F, 1994.

Aunque es importante señalar que queda fuera de los alcances del presente trabajo establecer que esta sucediendo, se carece de la información experimental suficiente para concretar el efecto de la concentración de enzima y explicar por qué se ve disminuida la velocidad de cambio ($\mu\text{mol } H_2O_2/\text{min}$) y poder concluir como lo hacen Nicell *et al* (1993). La posibilidad de que peroxidasa de rábano sea inhibida por alguna de las sustancias presentes en el

agua residual queda descartada ya que se hicieron determinaciones de actividad residual de peroxidasa en el sobrenadante, después del tratamiento de las muestras de agua, y no se encontró una disminución importante en la actividad de la enzima.

Se sugiere que para reportar valores de actividad de peroxidasa sobre el agua residual empleada se repita el experimento efectuando determinaciones de consumo de H_2O_2 a espacios de tiempo cortos, como en los primeros 15min, pues así se evitan factores de no linealidad (factores antes mencionados) además, se minimiza el error experimental en las mediciones.

En la figura 3 se observa que en general conforme aumenta la concentración de peroxidasa aumenta la cantidad de H_2O_2 consumido. Sin embargo, después de 120 min la cantidad de H_2O_2 consumido es similar solo para las concentraciones más altas. Lo anterior sugiere que después de 2 horas de reacción el consumo de H_2O_2 podría permanecer constante a pesar de incrementar la concentración de enzima.

No obstante en la línea inferior se observa que el H_2O_2 se consume en ausencia de peroxidasa, ya que es capaz de oxidar a la materia orgánica directamente. Pese a esto último, la presencia de peroxidasa favorece un ligero aumento en el consumo de H_2O_2 . Sin embargo, la cantidad de H_2O_2 consumido para ambos casos solo representa un bajo porcentaje del peróxido total que ha sido adicionado como podrá notarse en las siguiente sección.

3.1.1 Determinación de H_2O_2 residual

Una vez concluido el tiempo de reacción de 3 hr se determinó H_2O_2 remanente en las muestras y los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. % de H_2O_2 remanente

Muestra	HRP $\mu\text{g/ml}$ total	H_2O_2 $\mu\text{g/ml}$ total	% H_2O_2 remanente
1	0.0000	268	64.54
2	0.5263	268	58.94
3	0.5405	268	53.16
4	0.7894	268	61.2
5	1.3157	268	62.0
6	5.4901	268	61.0

HRP: peroxidasa de rabano

Observamos que aunque la concentración de enzima aumenta, la cantidad de peróxido remanente se mantiene en 59.26% como promedio, esto es que hay exceso de enzima en el sistema con respecto a la concentración de aquel componente del agua que sea sustrato para peroxidasa.

Es necesario conocer si un bajo consumo de H_2O_2 esta provocando que la DQO no disminuya tanto como se desea.

3.2 Efecto de peroxidasa de rábano y H_2O_2 sobre la DQO

La DQO es un parámetro que nos indica la cantidad de materia orgánica removida ya que ésta al ser oxidada provoca una disminución en su valor (sección 2.7). Se procedió a calcular el % de disminución de la DQO en las muestras de agua residual tratadas con diferentes concentraciones de enzima peroxidasa. La DQO inicial para el agua residual fue de 5346 mgO_2/l .

En la Tabla 8 se muestra el porcentaje de disminución de la DQO.

Tabla 7. Disminución de DQO con respecto a la concentración de enzima (*)

	H_2O_2 (268 $\mu g/ml$)	HRP 0.5263 $\mu g/ml$	HRP 0.5405 $\mu g/ml$	HRP 0.7894 $\mu g/ml$	HRP 1.3157 $\mu g/ml$	HRP 5.4901 $\mu g/ml$
% H_2O_2 remanente	64.5	58.9	53.2	61.2	62	61
DQO (mgO_2/l)	2400.0 σ 217.8	2222.0 σ 154.7	2234.1 σ 359.3	1444.2 σ 165.3	2204.8 σ 314.9	2160.0 σ 92.4
% disminución de DQO	55.1 σ 4.1	58.4 σ 2.9	58.2 σ 6.8	73 σ 3.1	58.8 σ 5.9	59.6 σ 1.7

(*) todas las muestras contienen H_2O_2 (268 $\mu g/ml$) y la cantidad de HRP (peroxidasa de rábano) indicada.

Podemos notar que en la mayoría de los casos permanece más del 50% del total del peróxido adicionado. Es decir, no se aumenta el consumo de H_2O_2 al aumentar la concentración de enzima. Sin embargo, con el aumento de 0.5 a 0.7 $\mu g/ml$ de HRP se favorece la disminución de la DQO.

Puesto que la disminución de la DQO no es proporcional al % de H_2O_2 consumido, se sugiere que la disminución de DQO no se debe sólo a un efecto oxidante, sino también a un fenómeno de coagulación propiciado por la enzima. Esto es soportado por la observación de que el % de disminución de DQO aumenta ligeramente (Figura 4) a medida que aumenta la concentración de enzima hasta un máximo.

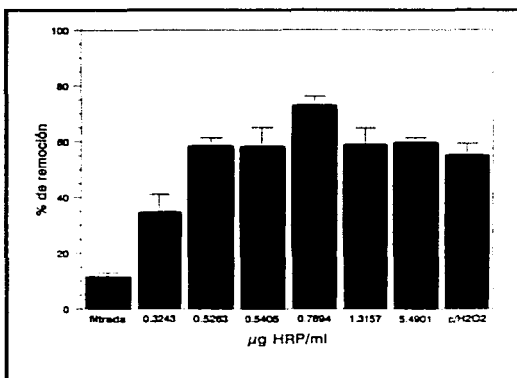


Figura 4. Efecto de la concentración de peroxidasa en la DQO.

En la gráfica también se indica el porcentaje de disminución en la DQO que se obtiene al efectuar una filtración simple a la muestra sin hacerle ningún tratamiento previo. Para el caso de las muestras que fueron tratadas, se dejaron sedimentar durante 24 hr y se filtraron (sección 2.6).

Con objeto de saber cuál de los tratamientos efectuados proporciona los mejores resultados los datos obtenidos de las determinaciones de DQO fueron analizados estadísticamente, por medio de un análisis de varianza con $\alpha = 0.01$ de confianza.

No se encontró diferencia significativa entre matraces y tampoco la hubo entre repeticiones. Pero sí hay diferencia entre los tratamientos.

A fin de conocer cuáles son los tratamientos en los que hay diferencia significativa se realizó la prueba de rango múltiple de Duncan.

Así se tuvo que el mejor tratamiento resultó ser el que se lleva a cabo con peroxidasa de rábano a una concentración de $0.7894 \mu\text{g/ml}$ de agua a tratar y H_2O_2 $268 \mu\text{g/ml}$ ya que se logra disminuir en 73% (σ 3.1) la DQO inicial. Este tratamiento resulta ser más eficiente que el realizado únicamente con H_2O_2 $268 \mu\text{g/ml}$ con el que solo se disminuye en 55.1% (σ 4.1).

Esta claro que una filtración simple no se compara en eficiencia con los tratamientos empleados pues sólo es posible remover 11.6% (σ 1.3).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Como se ha sugerido, la adición de peroxidasa de rábano al sistema puede estar presentando un comportamiento como agente coagulante.

3.3 Evaluación del efecto coagulante

Con el fin de comprobar si la peroxidasa de rábano se comporta como agente coagulante promotor de sedimentación en este sistema, se procedió a determinar el efecto de la adición únicamente de peroxidasa (sin H_2O_2) sobre la DQO (sección 2.8). Se probaron diferentes concentraciones y se compararon con otros agentes coagulantes de uso común en el tratamiento de aguas como son $FeCl_3$ y alginatos. Además se empleó una proteína inerte como control (albúmina de suero bovina -ASB).

La Tabla 9 resume los resultados obtenidos en la disminución de DQO inicial (3304.8 mgO_2/l , muestra diluida (+)) con respecto a la concentración del coagulante.

Tabla 8. Efecto de la adición de un coagulante en la DQO.

	$FeCl_3$ (5mg/ml)	HRP 0.3243 μ g/ml	HRP 0.5405 μ g/ml	HRP 0.7894 μ g/ml	Alginatos 0.7894 μ g/ml	ASB 0.7894 μ g/ml	HRP 1.3157 μ g/ml	HRP 5.4901 μ g/ml
DQO (mgO_2/l)	2346.0 σ 390.6	1857.8 σ 0.0	1101.6 σ 129.6	1600.0 σ 0.0	2142.0 σ 204.0	1933.2 σ 133.3	1938.0 σ 117.8	1624.9 σ 268.0
% disminución DQO	29.0 σ 11.3	43.8 σ 0.0	66.6 σ 3.95	51.6 σ 0.0	35.2 σ 5.2	41.5 σ 4.05	41.4 σ 3.5	50.8 σ 8.1

De los resultados presentados en la tabla anterior tenemos que la peroxidasa de rábano actúa como agente coagulante, pues bajo las condiciones de evaluación (ausencia de H_2O_2) no se presenta la actividad catalítica natural de la enzima y aún así se logra disminuir la DQO inicial por lo menos en 50%. El agua residual no contenía sustancias que pudieran sustituir al H_2O_2 en la reacción de oxidación que cataliza la enzima, ya que al aplicar el método colorimétrico con ABTS (Pünter and Becker, 1983) y agua residual en lugar de H_2O_2 , se comprobó que no había reacción positiva. Esto refuerza que la disminución de la DQO se debe a un efecto ajeno a su comportamiento como catalizador.

En el caso de albúmina de suero bovina (proteína inerte) se presenta un efecto similar que permite la disminución de la DQO aunque en menor medida (51.6 Vs 41.5%). Esta diferencia que hay en el porcentaje de disminución de DQO entre peroxidasa y albúmina, puede deberse a que sus residuos de aminoácidos son diferentes y/o algunos se hallan en mayor proporción que otros. Se sabe que industrialmente la gnetina es la proteína más comúnmente usada para clarificar bebidas debido a su afinidad selectiva por taninos, proantocianidinas y otros polifenoles. Al parecer, el más importante tipo de unión, aunque probablemente no el único, entre los taninos y proteínas involucra enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo (-OH) del compuesto fenólico y grupos amida de proteínas (Fennema, 1985). Es posible que la peroxidasa esté presentando interacciones semejantes.

Cuando se adiciona un polímero no proteico como el alginato, la disminución de la DQO es menor que para las anteriores. Esto podría deberse al tamaño de la cadena polimérica.

En la siguiente figura observamos de manera gráfica los resultados señalados con anterioridad.

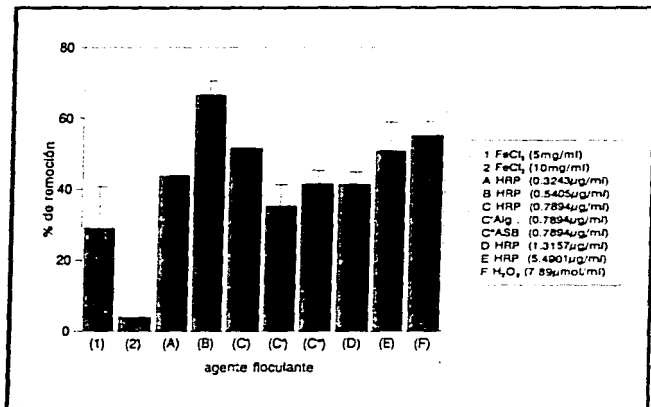


Figura 5. Efecto del coagulante en la DQO.

Se hizo el análisis estadístico antes mencionado. No se encontraron diferencias significativas entre matraces y tampoco entre repeticiones. Pero si entre los tratamientos efectuados.

De nueva cuenta se realizó la prueba de rango múltiple de Duncan.

El mejor tratamiento resulta ser el (B) a una concentración de peroxidasa de rábano de 0.5405 μ g/ml, que permite disminuir la DQO en 66.6% (σ 3.95).

3.4 Comparación de los diferentes tratamientos

La siguiente Tabla resume los resultados obtenidos para los mejores tratamientos:

Tabla 9. Tabla comparativa

	H ₂ O ₂ 268µg/ml	HRP 0.5405µg/ml	HRP 0.7894µg/ml	HRP 0.7894µg/ml H ₂ O ₂ 268µg/ml
DQO (mgO ₂ /l)	2400.0 σ 217.8	1101.6(★) σ 129.6	1933.2(★) σ 133.3	1444.2 σ 165.3
% disminución DQO	55.1 σ 4.1	66.6 σ 3.95	51.6 σ 0.0	72.9 σ 3.1

(★) para la muestra diluida, con DQO inicial de 3304 8mgO₂/l.

Puede notarse que los tratamientos con H₂O₂ (268µg/ml) únicamente y peroxidasa únicamente a 0.7894µg/ml reducen más o menos el mismo porcentaje la DQO. En contra parte, el tratamiento conjunto con H₂O₂ (268µg/ml) + peroxidasa (0.7894µg/ml) ocasiona la más alta reducción de la DQO. Todo indica que en éste último caso ocurre un efecto sinérgico de la acción oxidante del conjunto H₂O₂-HRP y la acción coagulante de peroxidasa.

Resulta conveniente mencionar que la Norma Oficial Mexicana NOM.CCA-005-ECOL/1993 para aguas residuales provenientes de la industria de fabricación de productos plásticos y polímeros sintéticos descargada en cuerpos receptores es:

El límite máximo permisible de DQO es:

- promedio diario 200mgO₂/l
- instantáneo 240mgO₂/l.

El tratamiento aquí planteado permite lograr disminuir la DQO en por lo menos el 50% en tan solo 3 horas de reacción; para bajar la DQO hasta la requerida por la norma deberá aplicarse un tratamiento posterior a alguno de estos, como puede ser un tratamiento biológico o algún método químico ya probado para este tipo de agua. Esto, desde luego, bajo un contexto meramente teórico y sin considerar una evaluación económica.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES

- ♣ Peroxidasa de rábano tipo II presenta una eficiencia en más del 50% en la remoción de compuestos orgánicos en aguas procedentes de Celanese Mexicana (planta Querétaro). Por lo tanto esta agua residual presenta sustancias que son sustrato de la enzima.
- ♣ El comportamiento que peroxidasa de rábano presentó durante la remoción de materia orgánica en este efluente, es en gran medida la de un agente coagulante, pues su actividad catalítica no repercute en una considerable disminución de la DQO.
- ♣ Las mejores condiciones para alcanzar una remoción cercana al 80% son: de 0.7894µg/ml de peroxidasa y 268µg/ml de H₂O₂, a temperatura de 31°C y agitación durante un tiempo de 3 horas de reacción.
- ♣ El tratamiento solo con peroxidasa (0.5405µg/ml) o con H₂O₂ (268µg/ml) permite la disminución de DQO en más del 50%.
- ♣ Las enzimas presentan un potencial interesante en la remediación de aguas industriales, sujeto a que reúnan requisitos de economía en relación a otros procesos fisicoquímicos o biológicos.

ANEXO

L- Norma Oficial Mexicana NOM-CCA-005-ECOL/1993

NORMA Oficial Mexicana NOM-CCA-005-ECOL/1993, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de la industria de fabricación de productos plásticos y polímeros sintéticos.

5. ESPECIFICACIONES

5.1 Las descargas de aguas residuales provenientes de la industria de los plásticos y plímeros sintéticos deben cumplir con las especificaciones que se indican en la Tabla 1.

PARAMETROS	LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES	
	Promedio diario	instantáneo
pH (unidades de pH)	6-9	6-9
Sólidos suspendidos totales (mg/l)	70	84
Grasas y aceites (mg/l)	15	20
Sólidos sedimentables (mg/ml)	1.0	1.2
Fluoruros (mg/l)	10	15
Demanda química de oxígeno (mg/l)	200	240
Demanda bioquímica de oxígeno (mg/l)	100	120
Fenoles (mg/l)	0.5	0.75

Tabla 1.

5.1.1 Para fines de la presente norma se entenderá por límite máximo permisible promedio diario, los valores, rangos y concentraciones de los parámetros que debe cumplir el responsable de la descarga, en función del análisis de muestras compuestas de las aguas residuales provenientes de esta industria.

5.1.2 Para fines de la presente norma se entenderá por límite máximo permisible instantáneo, los valores, rangos y concentraciones de los parámetros que debe cumplir el responsable de la descarga, en función del análisis de muestras instantáneas de las aguas residuales provenientes de esta industria.

5.1.3 En el caso de que el agua de abastecimiento contenga alguno de los parámetros que se encuentran regulados en esta norma, no será imputable al responsable de la descarga, y éste tendrá el derecho a que la autoridad competente le fije, previa solicitud, condiciones particulares de descarga que tomen en cuenta lo anterior.

5.2 Los límites máximos permisibles de coliformes totales medidos como número más probable por cada 100ml en las descargas de aguas residuales provenientes de la industria de productos plásticos y polímeros sintéticos considerando las aguas de servicios son:

5.2.1 1, 000 como límite promedio diario y 1, 000 como límite instantáneo de las aguas residuales de los procesos industriales.

5.2.2 10, 000 como límite promedio diario y 20, 000 como límite instantáneo cuando se permita el escurrimiento libre de las aguas residuales de servicios o su descarga a un cuerpo receptor, mezcladas con las aguas residuales del proceso industrial.

5.2.3 Sin límite, en el caso de que las aguas residuales de servicios se descarguen separadamente y el proceso para su depuración prevea su infiltración en el terreno, de manera que no se cause un efecto adverso en los cuerpos receptores.

5.3 Condiciones particulares de descarga

En el caso de que se identifiquen descargas que a pesar del cumplimiento de los límites máximos permisibles establecidos en esta norma causen efectos negativos en el cuerpo receptor, la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos a través de la Comisión Nacional del Agua, fijará condiciones particulares de descarga para señalar límites más estrictos de los parámetros de la tabla 1; además, podrá establecer límites máximos permisibles si los considera necesario, en los siguientes parámetros:

- Cianuros
- Compuestos orgánicos nitrogenados
- Conductividad eléctrica
- Derivados celulósicos
- Fósforo total
- Materia flotante
- Metales pesados
- Poliámidas
- Resinas acrílicas
- Silicones
- Sólidos disueltos totales
- Temperatura
- Tóxicos orgánicos
- Unidades de toxicidad aguda con Daphnia magna

5.3.1 Para el caso de tóxicos orgánicos y metales pesados se considerarán los incluidos en el Anexo A de la norma oficial mexicana NOM-CCA-001-ECOL/1993 referida el punto 3.

CAPÍTULO 5

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Alberti, B. N.; Klibanov, A. M. "Enzymic removal of dissolved aromatics from aqueous effluents". *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 11, (1981).
- 2.- Arnao, M. B.; Acosta, M.; del Río, J. A.; Varon, R. and García, C. F. "A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide". *Biochim. Biophys. Acta* 1041, 43-47.
- 3.- Association Health and Public. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 19th edition, pp. 5.10-5.18, (1989).
- 4.- Carmichael, R. D.; Fedorak, P. M. and Pickard, M. A. "Oxidation of phenols by chloroperoxidase". *Biotechnol. Lett.* 7: 289-294, (1994); Citado en Pickard M. A. *et al* (1991).
- 5.- DIARIO OFICIAL . 2a sección. NORMA Oficial Mexicana NOM-CCA-005-ECOL/1993, pp. 16-20, 18 de octubre de 1993.
- 6.- Fennema, O. R. Food Chemistry, 2a. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York, U. S. A., pp.662, (1985).
- 7.- Ferrer, I.; Dezzotti, M.; Duran, N. "Decolorization of kraft effluent by free and immobilized lignin peroxidase and horseradish peroxidase". *Biotechnol. Lett.* 13: 577-582, (1991).
- 8.- Guibault, G. "Use of enzymes in Analytical Chemistry". *Anal. Chem.* 40 (5), pp.190-196, (1968).
- 9.- Harry, M. Freeman. Standard Handbook of hazardous waste treatment and disposal. Editor in chief, by McGraw Hill, Inc. U. S. A. Sección 7.1, 7.41-7.47, (1989).
- 10.- Illanes, A. Biotecnología de Enzimas, Ediciones universitarias de Valparaíso de la Universidad católica de Valparaíso, Chile. pp. 36-42, (1994).
- 11.- Klibanov, A. M.; Tu t. and Scott K. P. "Peroxidase catalyzed removal phenols from coal-conversion wastewater". *Science* 221, 259-261, (1983).
- 12.- Lemus Rivera. "Remoción de carbono orgánico y nitrógeno mediante un reactor anaerobio". *Tesis de licenciatura*. Facultad de Química, UNAM, (1990).

- 13.- Maloney, S. W.; Manem, J.; Mallevalle, J. and Flessinger, F. "The potential use of enzymes for removal of aromatic compound from water". *Wat. Sci. Tech.* Vol. 17 pp. 273-278, (1984).
- 14.- Maloney, S. W.; Manem, J.; Mallevalle J. and Flessinger, F. "Transformation of trace organic compounds in drinking water by enzymic oxidative coupling". *Environ. Sci. Technol.* 20, 249-253 (1986).
- 15.- **Merck Index**, 17 th. edition. Publicado por Merck and CO., INC. New Jersey, U.S.A., (1989).
- 16.- Metcalf and Eddy. **Wastewater Engineering Treatment, Disposal and Reuse**. Inc. 3rd. edition. MacGraw-Hill. pp 47-52, 70, 82, 125-129, 195, 229, 302-311.
- 17.- Nakamoto S. and Machida N. "Phenol removal from aqueous solutions by peroxidase catalyzed reaction using aditives". *Wat. Res.* 26 (1), 49-54, (1992).
- 18.- Nakayama, **Removal of phenols and aromatic amines from wastewater with peroxidase**. Patente, Patente japonesa, (1992).
- 19.- Nicell, J. A.; Bewtra J. K.; Biswas N. and Taylor E. "Reactor development for peroxidase catalyzed polymerization and precipitation of phenols from wastewater". *Wat. Res.* 27 (11), 1629-1639, (1983).
- 20.- Nicell, J. A.; Bewtra, J. K.; Taylor K. E. and Biswas, N. "Enzyme catalyzed polymerization and precipitation of aromatics compounds from wastewater". *Wat. Sci. Tech.* 25 (3), 157-164, (1992).
- 21.- Pickard, A. M.; Tenshuk, A. Kadima and Carmichael, R. D. "Chloroperoxidase, a peroxidase with potential". *J. Industrial Microbiol.* 7, 235-242, (1991).
- 22.- Pütter J. and Becker R., Peroxidases, en: Bergmeyer, H. **Methods of Enzymic Analysis**, 3rd edition. Ed. Verlag Chemie Weinheim. Vol. 3, pp.286-293, (1983).
- 23.- Siddique, M. H., St. Pierre, C. C.; Biswas, N.; Bewtra, J. K. and Taylor, K. E. "Immobilized enzyme catalyzed removal of 4-dichlorophenol from aqueous solution". *Wat. Res.* 27 (5), 883-890, (1993).
- 24.- Stucchi, E. **Industrial Chemistry**, Edi. Ellis Horwood. Chichester, England. pp 112, 117,118, (1990).
- 25.- Tatsuni, K.; Ichikawa, H.; Wada, S. "Dephenolization from aqueous-solution by treatment with peroxidase and coagulant". *Wat. Sci. Tech.* Vol. 30 Iss 9, 79-86, (1994).
- 26.- Walsh Christopher. **Enzymatic Reaction Mechanisms**, W. H. Freeman and Company. San Francisco U. S. A. pp. 488,489, (1979).

- 27.- Wu Jiangning; Taylor, K. E.; Bewtra, J. K. and Biswas, N. "Optimization of the reaction conditions for enzymatic removal of phenol from wastewater in the presence of polyethylene glycol". *Wat. Res.* 27 (12) pp 1701-1706. (1993).
- 28.- Zollner, H. **Handbook of Enzymes Inhibitors**. 2nd edition, Part A VCH Germany, pp 367, (1993).