

00551

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

(Posgrado en Ciencias)

21

Estudio sobre la biodegradabilidad del colorante azo marino
terasil por un lodo granular anaerobio vía sulfato-reducción

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

RAÚL SNELL CASTRO



MÉXICO, D.F. 2000



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.

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS

JURADO DE EXAMEN

PRESIDENTE	<i>Dra. Carmen Durán de Bazúa</i>
VOCAL	<i>Dr. Sergio Revah Moiseev</i>
SECRETARIO	<i>Dr. Guillermo Aguilar Osorio</i>
SUPLENTE	<i>Dra. Amanda Gálvez Mariscal</i>
SUPLENTE	<i>Dr. Simón González Martínez</i>

SUSTENTANTE

Biologo Raúl Snell Castro

TUTOR

Dr. Kuppusamy Ilangovan

CÓMITE TUTORIAL

Dr. Kuppusamy Ilangovan
Dr. Guillermo Aguilar Osorio
Dr. Oscar Monroy Hermosillo

Este trabajo fue realizado en:

La Universidad Nacional Autónoma de México, en la Coordinación de
Bioprocesos Ambientales del Instituto de Ingeniería
y bajo la tutela del Dr. Kuppusamy Ilangovan

Universidad de Valladolid, España; en el Departamento de Ingeniería Química
y bajo la dirección del Dr. Fernando Fernández Polanco

AGRADECIMIENTOS

La finalización de esta tesis no la hubiera logrado sin el apoyo de varias personas que quiero y estimo. Primeramente, agradezco a mi familia todo el cariño que me ha brindado durante este tiempo, especialmente a mi mamá, quien no deja de ayudarme y aunque en ocasiones no pueda lo ha intentado.

A mi novia Alexandra, le agradezco su cariño y apoyo en momentos difíciles.

Mis compañeros de laboratorio (susanitos, noyolitos, buitrones e ilanes) me ayudaron mucho para que esta tesis se realizara en un tiempo razonable, agradezco especialmente a Lucy, Adidom, Norma, Magi, Hector, Arturo, Santiago, etc.; quienes sin conocerme me apoyaron y me permitieron quitarles mucho de su tiempo para poder aprender muchas cosas que hasta ese momento desconocía.

Esta tesis no se hubiera logrado sin el apoyo de los Doctores Fernando Fernández Polanco y Pedro García Encina, quienes aceptaron a un desconocido mexicano en su grupo de trabajo para desarrollar un proyecto que no correspondía a sus líneas de investigación, les agradezco mucho y esta tesis es de ustedes. Igualmente quiero agradecer a mis compañeros de la Universidad de Valladolid en España, quienes me apoyaron de la mejor manera, gracias al animalejo antropomorfo "Jesy", a Maricruz, Marisa, Cesar, Mar y puñalón (Santiago).

Agradezco al Dr. Ilangovan la oportunidad de realizar esta tesis en su grupo de trabajo, asimismo agradezco el apoyo brindado por el Dr. Adalberto Noyola, la Dra. Amelia Farrés (perdón por meter la pata) y Lety.

Gracias al Programa de Intercambio Académico de la UNAM y al CONACyT por su apoyo económico.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	3
GLOSARIO Y NOMENCLATURA	5
CAPÍTULO 1. Introducción	7
1.1. Objetivos de la investigación	8
1.2. Hipótesis de trabajo	9
1.3. Estrategia general	11
CAPÍTULO 2. Marco teórico	12
2.1. La industria textil	12
2.1.1. Legislación aplicada a la industria textil en México	12
2.1.2. Legislación aplicada a la industria textil en otros países.	13
2.2. Generalidades sobre colorantes	15
2.2.1. Clasificación y características de los colorantes	15
2.2.2. Color y constitución química	16
2.2.3. Síntesis de colorantes azo	17
2.2.4. Los colorantes en el ambiente	18
2.2.5. Toxicidad de los colorantes azo	19
2.3. Biodegradación de compuestos xenobióticos	19
2.3.1. Microorganismos degradadores de compuestos xenobióticos	20
2.3.2. Cometabolismo en la degradación de compuestos xenobióticos	21
2.4. Degradación de colorantes azo	22
2.4.1. Degradación parcial de colorantes azo	23
2.4.1.1. Degradación química (abiótica)	23
2.4.1.2. Degradación parcial bioquímica	28
2.4.2. Degradación completa de colorantes azo mediante microorganismos	32
2.4.2.1. Degradación completa en anaerobiosis	32
2.4.2.2. Degradación completa en sistemas anaerobio-aerobio	38
2.4.2.3. Degradación completa en aerobiosis	40

2.5. Generalidades sobre reactores	41
2.5.1. El concepto del reactor anaerobio de flujo ascendente de lecho de lodo ("UASB" por sus siglas en inglés)	41
2.5.2. Granulación en reactores tipo "UASB"	43
2.5.3. El concepto del reactor de lecho de lodo granular expandido, LLGE ("EGSB" por sus siglas en inglés)	44
CAPÍTULO 3. Caracterización del colorante azo marino terasil y del lodo granular anaerobio	45
3.1. Introducción	45
3.2. Materiales y métodos	46
3.3. Resultados y discusión	50
3.3.1. Caracterización del colorante azo "marino terasil"	50
3.3.2. Caracterización del lodo granular anaerobio	52
CAPÍTULO 4. Aclimatación del lodo granular anaerobio al colorante azo marino terasil en un reactor tipo EGSB sulfato-reductor	57
4.1. Introducción	57
4.2. Materiales y métodos	59
4.3. Resultados y discusión	63
4.3.1. Adsorción del colorante azo "marino terasil"	63
4.3.2. Aclimatación del lodo granular anaerobio	64
CAPÍTULO 5. Mineralización del colorante azo marino terasil por un lodo granular anaerobio en condiciones intermitentes ("batch") sulfato-reductoras	69
5.1. Introducción	69
5.2. Materiales y métodos	69
5.3. Resultados y discusión	70
CAPÍTULO 6. Efecto de la glucosa sobre la degradación parcial del colorante azo marino terasil por un lodo granular anaerobio en condiciones intermitentes ("batch") sulfato-reductoras	77
6.1. Introducción	77
6.2. Materiales y métodos	79
6.3. Resultados y discusión	79
CAPÍTULO 7. Identificación del grupo bacteriano involucrado en la actividad enzimática azorreductora	83
7.1. Introducción	83
7.2. Materiales y métodos	83
7.3. Resultados y discusión	84

CAPÍTULO 8. DISCUSIÓN GENERAL	86
CAPÍTULO 9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	88
ANEXOS	90
Anexo I. Diseños experimentales	90
I.I. Diseño experimental del Capítulo 3	90
I.II. Diseño experimental del Capítulo 4	91
I.III. Diseño experimental del Capítulo 5	91
I.IV. Diseño experimental del Capítulo 6	92
I.V. Diseño experimental del Capítulo 7	93
Anexo II. Preparación del medio de cultivo e inoculación para las pruebas intermitentes ("batch")	93
II.I. Preparación de medios anaerobios	93
II.II. Inoculación del medio para las pruebas intermitentes ("batch")	94
Anexo III. Soluciones y sustratos para la técnica del número más probable, NMP	96
III.I. Soluciones	96
III.II. Medio para los diferentes grupos bacterianos	98
III.III. Sustratos	98
REFERENCIAS	100

RESUMEN

En México se producen una gran cantidad de aguas residuales textiles, las cuales contienen colorantes azo, provenientes de los procesos de manufactura y/o tinción textil. Al ingresar al ambiente, los azocompuestos suelen ser degradados parcialmente (decoloración) a sus respectivas aminas aromáticas, que son carcinogénicas para los mamíferos. Aunado a esto, la legislación ambiental mexicana aplicable al caso sólo considera la pérdida del color. Lo expuesto con anterioridad convierte a los colorantes azo en un problema ambiental y de salud actual, por lo que el tratamiento de estos residuos es prioritario para el país. El objetivo de este trabajo fue comprobar la completa biodegradación del colorante azo denominado marino terasil (comercialmente: TERASIL NAVY GRL-01 200%) por un lodo granular anaerobio en condiciones sulfato-reductoras. Para lograrlo se realizó la aclimatación del lodo granular anaerobio al marino terasil en un reactor de lecho de lodo granular expandido ("LLGE") sulfatorreductor de 2.2 L de volumen de trabajo, el cual fue sembrado con lodo granular anaerobio (30% del volumen del reactor) obtenido de un reactor tipo UASB a escala industrial que trataba las aguas residuales de una maltería. El reactor fue operado continuamente a temperatura controlada de 35°C con un tiempo de residencia hidráulico de 1 d y alimentado con agua residual sintética que contenía 20 mg/L del colorante. El volumen de la cama de lodos fue expandido al 50% mediante el incremento del flujo del influente al recircular el efluente del reactor. Después de 28 días de aclimatación, se obtuvo un porcentaje de decoloración superior al 80% y una remoción de la DQO, representada por la glucosa (cosustrato), igual al 90%. Bajo estas condiciones, se observó la completa mineralización del azocompuesto, ya que al cuantificar la absorbancia del anillo aromático en el medio sólo se detectaron niveles de 1 mg/L. Dichos resultados fueron corroborados en pruebas intermitentes, donde se obtuvo un porcentaje de decoloración del 85% y una remoción de la DQO cercana al 80%. Sin embargo, la mineralización del colorante, en términos de la absorbancia del anillo aromático en el medio, fue incompleta, ya que se detectaron cantidades equivalentes al 50% de las aminas aromáticas generadas durante la decoloración, lo que podría indicar que una de las aminas aromáticas no fue degradada o el sistema sólo puede degradar alrededor de 20 mg/L del colorante. En relación con el efecto de la glucosa como cosustrato en el medio de cultivo, durante las pruebas intermitentes los resultados indicaron que la decoloración del marino terasil se realizó tanto en presencia como en ausencia del carbohidrato. El sistema con glucosa y 100 o 200 mg/L de colorante llevó a cabo el 80% de la decoloración a pesar de la existencia de un efecto negativo sobre las bacterias glucolíticas, ya que estas bacterias consumieron menos de la mitad de la glucosa presente en el medio. Por otra parte, la identificación del grupo bacteriano responsable de la decoloración no se logró mediante la técnica empleada, ya que no fue detectado ningún tipo de actividad. Esto no significa la inexistencia de azorreductasas, ya que quizás éstas pudieran ser intracelulares, lo que implicaría que la membrana celular bacteriana es permeable al marino terasil. De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluyó que el colorante puede ser degradado por el lodo granular anaerobio en un reactor de lecho de lodo granular expandido bajo condiciones sulfato-reductoras y que el cosustrato no es necesario para el rompimiento del enlace azo del colorante "marino terasil".

ABSTRACT

Mexico produce high levels of textile waste waters that contain azo dyes originated by dyeing process and synthesis and processing of colorants. These dyes go into the environment and they are reduced to the corresponding aromatic amines (decolourization) that are carcinogenic for the mammals. Besides, the environmental law of Mexico does not consider the textile effluents that contain azo dyes neither its products, the aromatic amines. These reasons have led to the fact that azo dyes are still an environmental and health problem and its treatment when present in textile waste waters is a priority for the country. The aim of this work was to study the biodegradation of the azo dye named "marino terasil" (commercially: TERASIL NAVY GRL-01 200%) by an anaerobic granular sludge in sulphate-reducing conditions. For making this, the sludge was acclimated to the azo dye in a sulphate-reducing expanded granular sludge blanket (EGSB) reactor with a capacity of 2.2 L. The lab scale reactor was operated under controlled temperature, 35°C, with a hydraulic residence time of 1 d and operated continuously. The reactor was seeded (30% volume of the reactor) with granular sludge obtained from a full scale upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor treating malting industry wastewater and fed with synthetic waste water containing 20 mg/L of the azo dye. The volume of the granular sludge bed reactor was expanded to 50 percent expansion volume through the increase of the influent flow rate by recycling the effluent of the reactor. After 28 days of acclimatization, a percentage of decolourization of 80% and a COD removal of 90% were obtained. That percentage of COD removal represent the COD of the glucose (cosubstrate). Under those conditions it was observed the complete degradation of azo dye, that was determined by the absorption of the aromatic ring in the media that yielded 1 mg/L. These results were checked in batch conditions with 50 mg/L of azo dye where a percentage of decolourization of 85% and a COD removal of 80% were obtained. However, the degradation of azo dye was incomplete, since there were detected amounts equivalent to 50% of aromatic rings, that is, the system can degrade around 20 mg/L of the aromatic amines originated by the breakdown of azo dye. With respect to glucose addition as cosubstrate, under batch conditions the decolourization was carried out with or without glucose in the media. The systems with glucose and the addition of 100 or 200 mg/L of azo dye carried out 80% of decolourization, but a negative effect on glucose assimilation was observed, that effect was interpreted like an effect toxic on the bacteria that oxidize glucose. The identification of the bacterial group responsible for the decolourization was not detected by the methodology used. These results do not mean the inexistence of azoreductases, since they might be intracellular implying the entrance of the dye through the cell wall. In accordance with the results obtained, it may be concluded that the azo dye "marino terasil" was degraded by the anaerobic granular sludge under sulphate-reducing conditions in an EGSB reactor; also, the cosubstrate was unnecessary for the cleavage of the azo bond (decolourization) of the dye "marino terasil".

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS:

- TABLA 2.1.** Norma Oficial Mexicana NOM-CCA-014-ECOL/1993 (ahora sustituida por la NOM-001-ECOL-1996 y la NOM-002-ECOL-1996)
- TABLA 2.2.** Lista de colorantes considerados como tóxicos por la asociación ecológica y toxicológica de las industrias manufactureras de colorantes
- TABLA 2.3.** Lista de las aminas aromáticas prohibidas por la legislación alemana a partir de 1995
- TABLA 2.4.** Clasificación y propiedades de los colorantes
- TABLA 2.5.** Grado de biodegradabilidad de algunos compuestos xenobióticos
- TABLA 2.6.** Características asociadas al ambiente y a los compuestos que afectan su biodegradabilidad
- TABLA 2.7.** Microorganismos degradadores de compuestos xenobióticos
- TABLA 2.8.** Procesos biológicos y condiciones ambientales bajo las cuales las bacterias podrían transformar ciertos compuestos orgánicos
- TABLA 2.9.** Bacterias que reducen el grupo azo enzimáticamente en condiciones anaerobias
- TABLA 2.10.** Microorganismos que reducen el grupo azo enzimáticamente en condiciones aerobias
- TABLA 3.1.** Porcentaje de decoloración del marino terasil ante algunos factores físicos y químicos involucrados en las pruebas posteriores de aclimatación y biodegradación
- TABLA 3.2.** Granulometría del lodo en estudio
- TABLA 3.3.** Estimación del número más probable de células de cada grupo bacteriano contenido en el lodo
- TABLA 3.4.** Algunas características del lodo granular anaerobio
- TABLA 4.1.** Resumen de las relaciones DQO/SO₄⁻ y eficiencias de remoción de la DQO
- TABLA 4.2.** Adsorción del colorante azo marino terasil
- TABLA 5.1.** Producción de gases durante la prueba de mineralización del colorante azo marino terasil

FIGURAS:

- FIGURA 2.1.** Estructura de resonancia del colorante azo anaranjado de metilo
- FIGURA 2.2.** Reacciones químicas para la síntesis de colorantes azo
- FIGURA 2.3.** Rutas seguidas por los colorantes en el ambiente
- FIGURA 2.4.** Fotooxidación del colorante 1-(*p*-nitrofenilazo)-2-naftol en metanol y acetona
- FIGURA 2.5.** Interacción entre los grupos *o*-nitro y azo para formar un puente de hidrógeno
- FIGURA 2.6.** Representación conceptual del sistema de reducción abiótica en condiciones anaerobias
- FIGURA 2.7.** Esquema del mecanismo general para la oxidación de compuestos hidroxiazos
- FIGURA 2.8.** Mecanismos propuestos para la degradación parcial de colorantes azo en solución diluida de hipoclorito de sodio
- FIGURA 2.9.** Reducción (decoloración) del colorante azo anaranjado ácido 7

- FIGURA 2.10. Esquema propuesto para la degradación anaerobia del colorante azodisalicilato por un consorcio metanogénico
- FIGURA 2.11. Esquema propuesto para la degradación anaerobia del colorante azo anaranjado mordente 1 por un lodo granular en un reactor tipo UASB que contenía glucosa como cosustrato
- FIGURA 2.12. Esquema de la vía de degradación anaerobia para compuestos aromáticos
- FIGURA 2.13. Competencia por el sustrato acetato entre bacterias sulfato-reductoras y metanógenas
- FIGURA 2.14. Metabolismo del trinitrotolueno cuando es asimilado como fuente de nitrógeno, el piruvato es el donador de electrones y el sulfato es el aceptor de electrones
- FIGURA 2.15. Ruta de biodegradación propuesta para el colorante azo amarillo mordente 3 por una comunidad bacteriana mixta
- FIGURA 2.16. Biodegradación de compuestos aromáticos en condiciones aerobias
- FIGURA 2.17. Representación esquemática de un reactor UASB
- FIGURA 3.1. Estructura química del colorante azo marino terasil
- FIGURA 4.1. Degradación anaerobia de anilina por *Desulfobacterium anilini* propuesta por Schnell y Schink 1991
- FIGURA 4.2. Diagrama del reactor tipo EGSB (EXPANDED GRANULAR SLUDGE BLANKET) o LLGE (LECHO DE LODO GRANULAR EXPANDIDO) usado para la aclimatación del lodo granular anaerobio al colorante azo marino terasil
- FIGURA 6.1. Hipótesis sobre el efecto del cosustrato (glucosa)

CAPÍTULO 1. Introducción

A partir de 1856, año en que se creó el primer colorante sintético llamado Mauve, se inició un rápido desarrollo de muchos otros colorantes. El primero de éstos, con un grupo azo, fue sintetizado en 1861 (Bishop, 1996). En la actualidad, se manufacturan aproximadamente 10,000 colorantes (Donlon y col., 1997), alcanzando una producción de 700,000 toneladas por año a nivel mundial, de las cuales más del 50% son usadas para teñir textiles, siendo la mayoría colorantes azo y Estados Unidos de América su principal consumidor (Bishop, 1996; Ilangovan, 1996). Los colorantes azo se caracterizan por tener como cromóforo al grupo azo (-N=N-) usualmente asociado a grupos hidroxilo o amino auxocrómicos. Existen aproximadamente 3000 colorantes azo, habiéndose descrito más de 2000 estructuras químicas. Estos colorante poseen una amplia gama de aplicaciones: Para fibras naturales y sintéticas, pigmentos y disolventes, para aplicación en fármacos, alimentos y cosméticos e indicadores ácido-base. Incluyen colorantes de tipo ácido, mordentes y directos con matices que típicamente van del amarillo verdoso al rojo, azul y verde (García, 1996; Morrison y Boyd, 1987).

México, como país industrializado y urbanizado, produce alrededor de 105 m³/s de aguas residuales municipales, 79 m³/s de aguas residuales y 2.2 millones de ton/año de carga orgánica en cuerpos de agua; asimismo, genera 5.3 ton/año de residuos sólidos e industriales peligrosos (Bishop, 1996). En el caso de los colorantes, aproximadamente 100,000 toneladas de colorante por año son depositadas en los efluentes textiles debido a que durante la manufactura de los colorantes cerca del 15% de la producción se pierde en las descargas de agua residual originadas en los procesos; aunado a esto, en los procesos de tinción textil solo del 60 al 90% del colorante aplicado es fijado al producto, lo restante se pierde en las aguas residuales después de la tinción (Bishop, 1996). Todo esto convierte a los colorantes en un problema ambiental y de salud actual, por lo que el tratamiento de estos residuos es prioritario para el país (Bishop, 1996). A pesar de lo anterior, la investigación básica sobre los procesos para la biodegradación de colorantes azo contenidos en aguas residuales ha iniciado hace un par de décadas y se han enfocado a estudiar la completa biodegradación del colorante. La importancia de conocer el proceso de degradación del azocompuesto radica en que el colorante como tal es tóxico para la mayor parte de las bacterias, luego entonces, éstas lo degradan parcialmente hasta las respectivas aminas aromáticas por reducción del enlace azo, las aminas, que son menos tóxicas para las bacterias, son carcinogénicas para los mamíferos y han sido asociadas a varios cánceres humanos. Este hecho obliga a que los tratamientos para eliminar a los colorantes azo de las aguas residuales sean muy eficientes.

La Empresa Ciba-Geigy Mexicana S.A. de C.V., ha desarrollado el colorante azo marino terasil disperso, que tiene como característica una eficiente fijación al tejido durante los procesos textiles de teñido y lavado. Esto, aunado a la demanda de colorantes azules para al industria textil, lo convierte en un producto con un gran mercado en México. Lo anterior condujo a la investigación de un proceso para el tratamiento de aguas residuales que contenían al marino terasil u otros colorantes azo. Tales estudios concluyeron que mediante un proceso biológico anaerobio en un reactor de lecho de lodo granular expandido ("LLGE") sulfatorreductor se obtenía un alto porcentaje de remoción del contenido de material disuelto medido como DQO, que implicaba la biodegradación del colorante (Ilangovan y Briones, 1995). Para confirmar con más detalle la eficiencia de dicho proceso se planteó un estudio fisiológico y bioquímico con el objetivo de verificar la biodegradación del marino terasil por un lodo granular anaerobio en condiciones sulfatorreductoras. A continuación, se detallan los objetivos de la investigación y la hipótesis de trabajo desarrollada para este estudio.

GLOSARIO Y NOMENCLATURA

GLOSARIO:

Adsorción.- Tendencia de las partículas de una sustancia a adherirse en ciertas superficies sólidas.

ARS.- Agua residual sintética usada para alimentar el reactor LLGE durante la aclimatación.

BES.- Bromoetanosulfonato, compuesto inhibidor de la metanogénesis.

BTEX.- Benceno, tolueno, etilbenceno y xileno.

Agua residual.- Agua procedente de desagües domésticos e industriales.

Agua residual tratada.- Agua residual sometida a un proceso de tratamiento para ser reutilizada.

AGV.- Ácidos grasos volátiles, intermediarios en la degradación anaerobia de compuestos orgánicos.

Bacterias glucolíticas.- Bacterias que consumen o fermentan la glucosa (fermentativas).

Biogás.- Producto gaseoso generado por microorganismos al transformar el material orgánico presente en las aguas residuales.

Cama de lodos.- Sitio donde se colocan los lodos en un sistema.

Cargas orgánicas.- Cantidad de sustrato alimentado.

Caudal.- Flujo de agua, puede ser medida en unidades de L/s o m³/d/h/s.

CLAR.- Cromatografía de líquidos de alta resolución.

Cuerpos receptores.- Cuerpos que reciben el agua residual, como ríos, lagunas, suelo, etc.

Degradación anaerobia.- Equivale a la digestión.

Degradación de materia orgánica.- Disminución progresiva de materia orgánica medida como DQO.

Digestión.- Es la mineralización de la materia orgánica por un sistema microbiológico mixto en condiciones de ausencia de oxígeno o fuertemente reductoras.

DQO.- Demanda química de oxígeno.

DQO_s.- Demanda química de oxígeno soluble.

Efluentes.- Corrientes de fluidos que salen de cualquier sistema.

Efluentes tratados.- Corriente de agua que sale del reactor, líquido relativamente exento de materia orgánica.

EGSB.- Expanded granular sledge blanket, acrónimo del nombre en inglés de un reactor anaerobio de lecho de lodo granular expandido.

ETAD.- Ecological and Toxicological Association of the Dyestuffs manufacturing industry, acrónimo del nombre en inglés de la asociación ecológica y toxicológica de las industrias manufactureras de colorantes.

Expansión de la cama de lodos.- Incremento del volumen o superficie de la cama de lodos.

Flóculo.- Partícula formada a partir de la unión de un floculante con una partícula coloidal.

Grupo cromóforo.- Grupos no saturados determinantes del color.

GS.- Glutamina sintasa.

HPLC.- High performance liquid chromatography, acrónimo del nombre en inglés de la cromatografía de líquidos de alta resolución.

Influente.- Agua residual de alimentación para un reactor.

IVL.- Índice volumétrico del lodo.

LLGE.- Lecho de lodo granular expandido.

Nitrógeno amoniacal.- Nitrógeno presente como sales de amoníaco.

OHPA.- Bacterias acetógenas productoras obligadas de hidrógeno (OHPA por las siglas en inglés: Obligated Hydrogen Producing Acetogen).

Procesos biológicos.- Procesos en los que la materia orgánica contaminante es utilizada como alimento por los microorganismos presentes en los tanques o reactores.

Producción de biogás.- Gas producido por la transformación del material orgánico presente en las aguas residuales, medido en (L/d).

PTS.- Phosphotransferase system, acrónimo del nombre en inglés del sistema de la fosfotransferasa.

RBB.- Colorante azo estudiado por Hu (1994).

Reactor.- Propulsor de una reacción.

Recirculación.- Hacer circular nuevamente parte de la corriente de salida hacia el sistema.

Relación α .- Relación de alcalinidades, a valores de pH de 4.3 y 5.75.

Remoción.- Eliminación mediante la transformación de las sustancias contenidas en las aguas residuales en otras más inocuas.

Remoción de color.- Cantidad de color removido del agua residual.

Remoción de DQO.- Materia orgánica soluble y total que es removida del agua residual.

Remoción de sulfatos.- Reducción de sulfatos a sulfuros.

RP₂B.- Colorante azo estudiado por Hu (1994).

Sedimentador.- Separa el agua tratada de los lodos por diferencia de densidades.

SSF.- Sólidos suspendidos fijos, medidos en mg/L.

SST.- Sólidos suspendidos totales, medidos en mg/L.

SSV.- Sólidos suspendidos volátiles, medidos en mg/L.

TRH.- Tiempo de residencia hidráulico, que se define como el tiempo en que el volumen líquido del reactor es retenido.

TRS.- Tiempo de retención de los sólidos en un reactor biológico.

UASB.- Upflow Anaerobic Sludge Blanket, acrónimo del nombre en inglés de un reactor anaerobio de flujo ascendente de lecho de lodo.

V₂RP.- Colorante azo estudiado por Hu (1994).

NOMENCLATURA:

α .- Alfa

β .- Beta

ΔG° .- Cambio de la energía libre estándar

ΔG° .- Cambio de la energía libre de Gibbs.

E_h .- Escala para expresar el potencial óxido-reducción de un sistema, medido en voltios.

pH.- Logaritmo de la concentración de hidrógeno.

V.- Voltio

W.- Watt

CAPÍTULO 1. Introducción

A partir de 1856, año en que se creó el primer colorante sintético llamado Mauve, se inició un rápido desarrollo de muchos otros colorantes. El primero de éstos, con un grupo azo, fue sintetizado en 1861 (Bishop, 1996). En la actualidad, se manufacturan aproximadamente 10,000 colorantes (Donlon y col., 1997), alcanzando una producción de 700,000 toneladas por año a nivel mundial, de las cuales más del 50% son usadas para teñir textiles, siendo la mayoría colorantes azo y Estados Unidos de América su principal consumidor (Bishop, 1996; Ilangovan, 1996). Los colorantes azo se caracterizan por tener como cromóforo al grupo azo (-N=N-) usualmente asociado a grupos hidroxilo o amino auxocrómicos. Existen aproximadamente 3000 colorantes azo, habiéndose descrito más de 2000 estructuras químicas. Estos colorante poseen una amplia gama de aplicaciones: Para fibras naturales y sintéticas, pigmentos y disolventes, para aplicación en fármacos, alimentos y cosméticos e indicadores ácido-base. Incluyen colorantes de tipo ácido, mordentes y directos con matices que típicamente van del amarillo verdoso al rojo, azul y verde (García, 1996; Morrison y Boyd, 1987).

México, como país industrializado y urbanizado, produce alrededor de 105 m³/s de aguas residuales municipales, 79 m³/s de aguas residuales y 2.2 millones de ton/año de carga orgánica en cuerpos de agua; asimismo, genera 5.3 ton/año de residuos sólidos e industriales peligrosos (Bishop, 1996). En el caso de los colorantes, aproximadamente 100,000 toneladas de colorante por año son depositadas en los efluentes textiles debido a que durante la manufactura de los colorantes cerca del 15% de la producción se pierde en las descargas de agua residual originadas en los procesos; aunado a esto, en los procesos de tinción textil solo del 60 al 90% del colorante aplicado es fijado al producto, lo restante se pierde en las aguas residuales después de la tinción (Bishop, 1996). Todo esto convierte a los colorantes en un problema ambiental y de salud actual, por lo que el tratamiento de estos residuos es prioritario para el país (Bishop, 1996). A pesar de lo anterior, la investigación básica sobre los procesos para la biodegradación de colorantes azo contenidos en aguas residuales ha iniciado hace un par de décadas y se han enfocado a estudiar la completa biodegradación del colorante. La importancia de conocer el proceso de degradación del azocompuesto radica en que el colorante como tal es tóxico para la mayor parte de las bacterias, luego entonces, éstas lo degradan parcialmente hasta las respectivas aminas aromáticas por reducción del enlace azo, las aminas, que son menos tóxicas para las bacterias, son carcinogénicas para los mamíferos y han sido asociadas a varios cánceres humanos. Este hecho obliga a que los tratamientos para eliminar a los colorantes azo de las aguas residuales sean muy eficientes.

La Empresa Ciba-Geigy Mexicana S.A. de C.V., ha desarrollado el colorante azo marino terasil disperso, que tiene como característica una eficiente fijación al tejido durante los procesos textiles de teñido y lavado. Esto, aunado a la demanda de colorantes azules para al industria textil, lo convierte en un producto con un gran mercado en México. Lo anterior condujo a la investigación de un proceso para el tratamiento de aguas residuales que contenían al marino terasil u otros colorantes azo. Tales estudios concluyeron que mediante un proceso biológico anaerobio en un reactor de lecho de lodo granular expandido ("LLGE") sulfatorreductor se obtenía un alto porcentaje de remoción del contenido de material disuelto medido como DQO, que implicaba la biodegradación del colorante (Ilangovan y Briones, 1995). Para confirmar con más detalle la eficiencia de dicho proceso se planteó un estudio fisiológico y bioquímico con el objetivo de verificar la biodegradación del marino terasil por un lodo granular anaerobio en condiciones sulfatorreductoras. A continuación, se detallan los objetivos de la investigación y la hipótesis de trabajo desarrollada para este estudio.

1.1. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo general

Comprobar la mineralización del colorante azo marino terasil disperso mediante un lodo granular anaerobio vía sulfato-reducción.

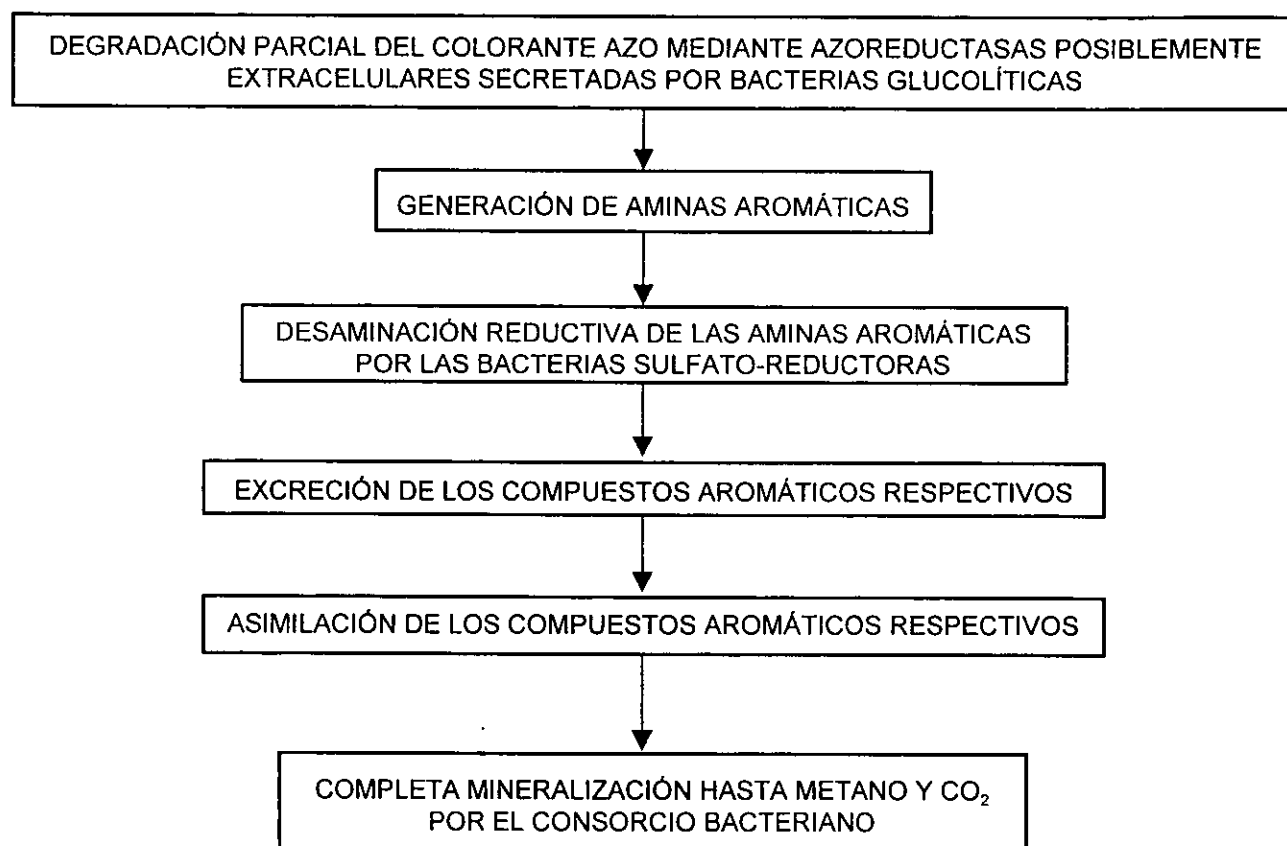
Objetivos particulares

1. Observar la estabilidad del colorante azo marino terasil ante factores físicos y químicos relacionados con la manipulación del mismo
 - 1.1. Analizar la estabilidad del colorante ante el pH, temperatura y procesos de esterilización.
 - 1.2. Analizar la estabilidad del colorante ante los medios de cultivo a emplear.
2. Verificar los parámetros relacionados con la cuantificación del colorante azo marino terasil
 - 2.3. Obtener el espectro y pico máximo de absorción del colorante.
 - 2.4. Determinar la DQO soluble del colorante.
3. Analizar las características físicas y microbiológicas del lodo granular anaerobio
 - 3.1. Determinar algunas características estructurales como la granulometría, velocidad de sedimentación e Índice volumétrico.
 - 3.2. Cuantificar los parámetros relacionados con la masa del lodo granular anaerobio como los SSV, SST, SSF y proteína.
 - 3.3. Conocer la intensidad del metabolismo metanogénico y sulfatorreductor mediante la determinación de las respectivas actividades.
 - 3.4. Conocer la cantidad aproximada de los principales grupos bacterianos contenidos en el lodo mediante la técnica del número más probable.
 - 3.5. Analizar la tolerancia del lodo ante el colorante mediante su efecto sobre la actividad metanogénica.
4. Aclimatar el lodo granular anaerobio en un reactor LLGE (EGSB) sulfato-reductor
 - 4.1. Someter al sistema biológico a una concentración del colorante tolerable en un sistema limitado en fuentes de nitrógeno.
 - 4.2. Determinar la mineralización del colorante.
5. Estudiar la biodegradación del colorante azo marino terasil por un lodo granular anaerobio en reactores intermitentes sulfato-reductores
 - 5.1. Determinar la mineralización del marino terasil.
 - 5.2. Analizar la participación directa de un cosustrato sobre la biodegradación parcial del colorante azo y la tolerancia a altas concentraciones del mismo.
6. Elucidar al grupo bacteriano responsable de la degradación parcial del azocompuesto
 - 6.1. Observar la actividad azorreductasa en los grupos bacterianos sulfatorreductor, metanogénico y glucolítico.

1.2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

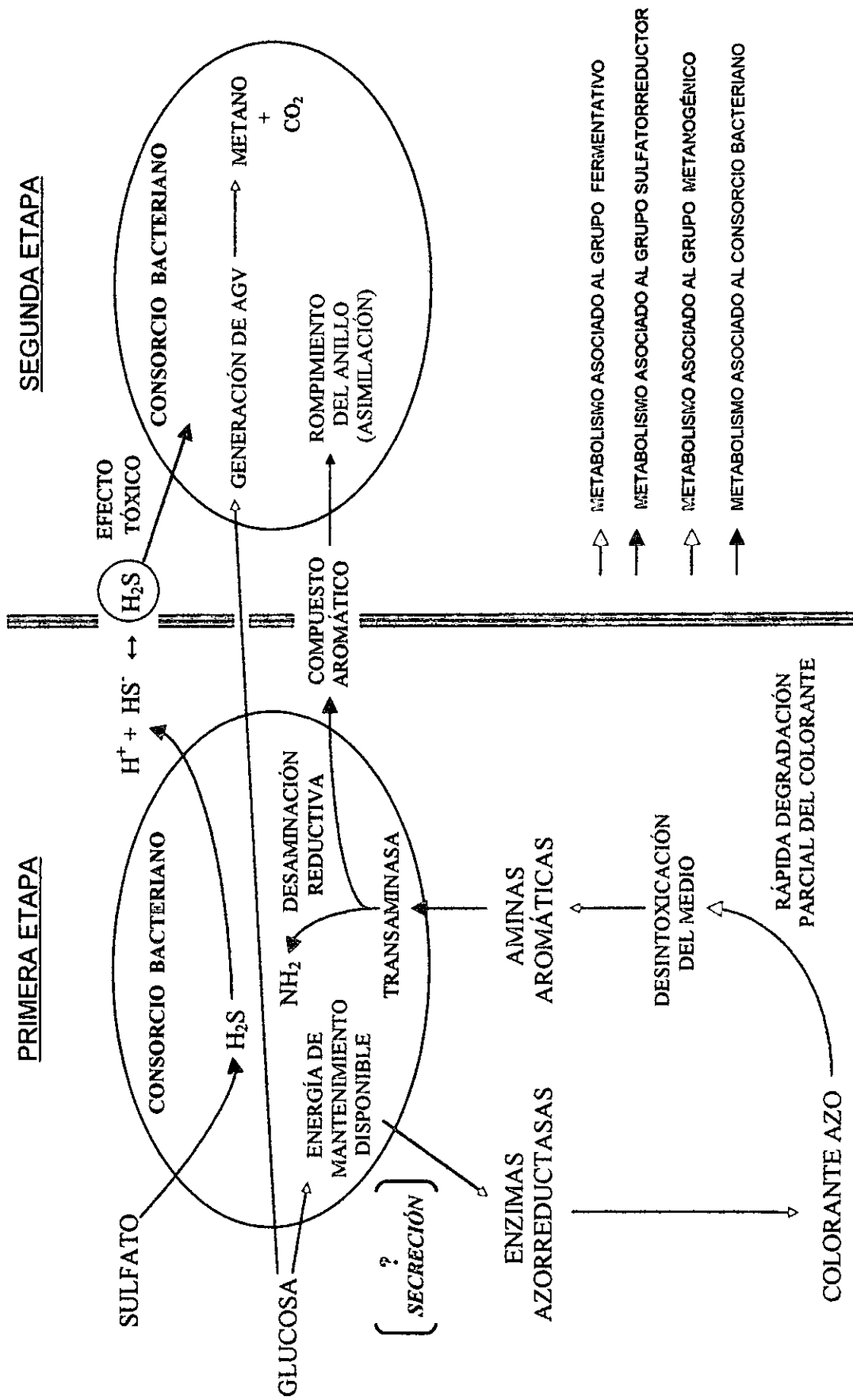
En la hipótesis de trabajo desarrollada, se plantea que el colorante marino terasil podría ser biodegradado parcialmente por azoreductasas secretadas por las bacterias glucolíticas hasta generar las correspondientes aminas aromáticas, aunque no se tiene una certeza sobre la secreción de las azoreductasas, ya que el colorante podría ser transportado al interior de las células. Posteriormente, dichas aminas serán desaminadas reductivamente por las bacterias sulfato-reductoras y el compuesto aromático respectivo será catabolizado por el consorcio bacteriano hasta metano y dióxido de carbono. En el siguiente diagrama de flujo se presenta la hipótesis expuesta.

DIAGRAMA DE FLUJO (HIPÓTESIS)



A continuación se muestra un esquema de la hipótesis basado en la información bibliográfica reunida y analizada en el marco teórico, objeto del siguiente capítulo, así como la estrategia general seguida en esta investigación.

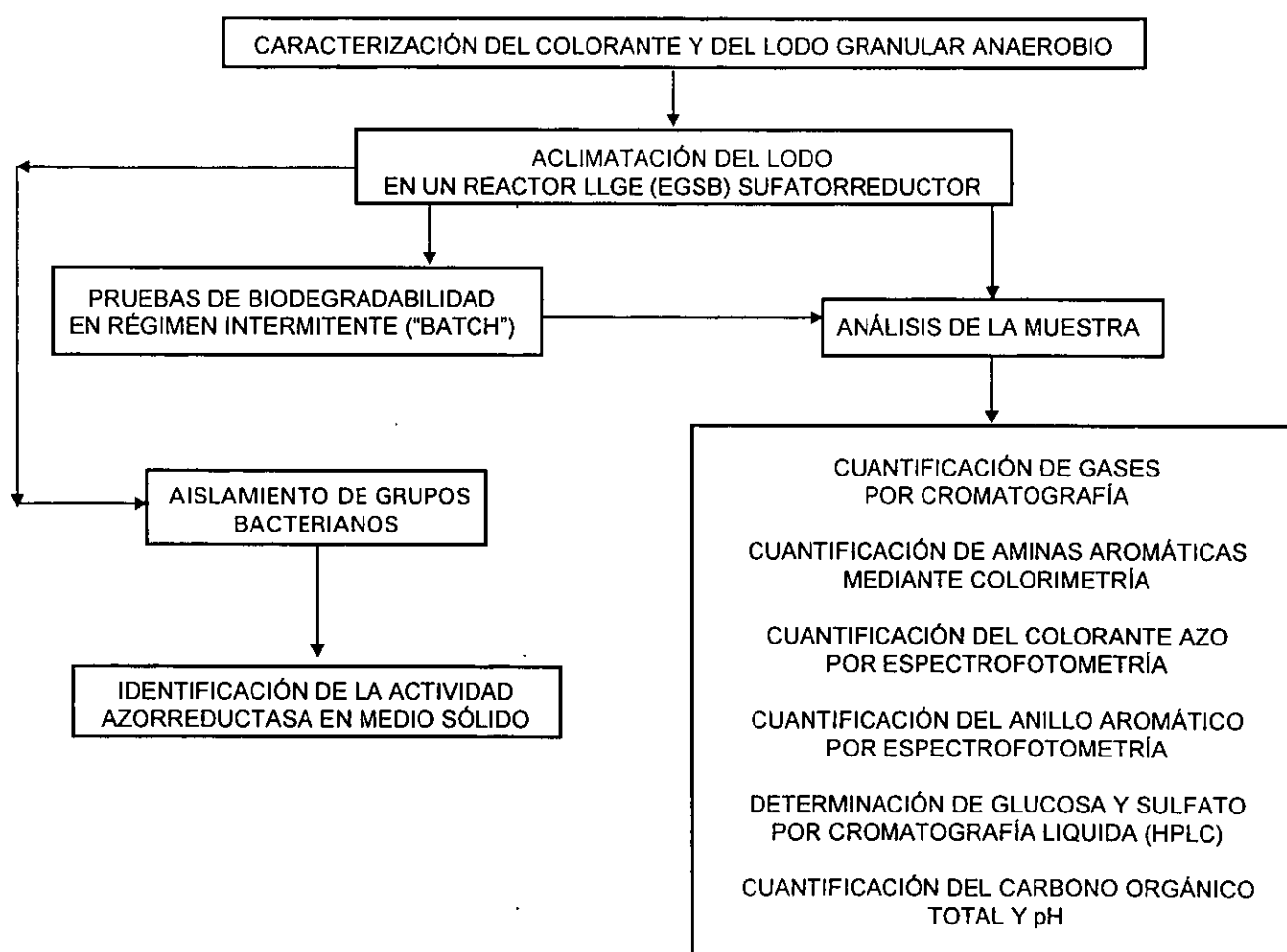
ESQUEMA DE LA HIPÓTESIS DE TRABAJO



1.3. ESTRATEGIA GENERAL

La estrategia que se elaboró para cumplir con los objetivos y comprobar la hipótesis planteada consistió en 1) Realizar la caracterización del colorante marino terasil y del lodo granular anaerobio a emplear. 2) Llevar a cabo la aclimatación del lodo al marino terasil en un reactor LLGE (EGSB) sulfatorreductor. 3) Realizar una prueba en un reactor intermitente para verificar la biodegradabilidad del colorante. 4) Evaluar el efecto de un cosustrato sobre la decoloración. Finalmente, 5) Efectuar la separación de los grupos bacterianos glucolítico, sulfatorreductor y metanogénico, para ser cultivados en medio sólido en presencia del colorante y observar una posible actividad azorreductasa. En el Anexo I se detalla el diseño experimental para cada inciso de esta estrategia y a continuación se muestra el diagrama de flujo.

DIAGRAMA DE FLUJO GENERAL (ESTRATEGIA)



Las bases teóricas y experimentales estudiadas para establecer los objetivos de la investigación y la hipótesis de trabajo, anteriormente planteados en este estudio, se presentan en el siguiente capítulo.

CAPÍTULO 2. Marco teórico

2.1. LA INDUSTRIA TEXTIL

De los diferentes sectores industriales, la industria textil (específicamente la de producción de telas, acabado y teñido de las mismas) y la rama del vestido son importantes generadoras de aguas residuales con un alto contenido de carga orgánica, dependiendo del proceso de elaboración, tipo de telas a producir, si se produce únicamente el textil y/o el acabado del mismo y las características de las fibras (sintéticas, naturales o mezclas de ambas); ésto origina una gran diversidad de efluentes. Pero el hecho más trascendente, es que se generan aguas con un alto contenido de color (colorantes y tintes de todo tipo). A nivel nacional, la industria textil ocupa un sexto lugar en la generación de aguas residuales (Ilangovan, 1996).

La Cámara Nacional de la Industria Textil tiene registradas un total de 1994 empresas dedicadas a la elaboración de textiles de algodón y mezcla poliéster-algodón, localizándose el 82% en el centro del país y concentrando el D. F. (719 empresas) y los Estados de México y Puebla (417 y 335 empresas, respectivamente) el 73% de dicha industria, lo cual se ha convertido en un problema ambiental y de salud pública para la región, debido al gran volumen de aguas residuales altamente contaminantes que se originan durante el proceso de fabricación de los diferentes productos textiles a partir de lana, algodón y fibras de origen sintético, ya que utilizan un gran número de sustancias químicas, tales como pectinas y algunos componentes no celulósicos, sosa cáustica, almidón, alcohol polivinílico, acetato polivinílico, carboximetil celulosa y una amplia variedad de colorantes (Ilangovan, 1996).

Aunque la mayoría de las etapas involucradas en el proceso de fabricación contribuyen al problema de contaminación de aguas residuales, sin duda las que participan en mayor medida son el restregado, teñido y acabado. El teñido participa enormemente en la generación de color en las aguas residuales, por lo que el principal problema es la eliminación de éste (Ilangovan, 1996). En el tratamiento de las aguas residuales de la industria textil, los contaminantes orgánicos pueden ser tratados usando reactores de células suspendidas o biopelículas, éstos últimos muestran frecuentemente mejor remoción de compuestos xenobióticos que los sistemas de células suspendidas, ya que se forman nichos especializados donde las bacterias de lento crecimiento degradadoras de contaminantes pueden desarrollarse sin competencia de las bacterias de rápido crecimiento; además, el tiempo de retención por parte del microorganismo en la biopelícula podría ser muy largo, lo cual es una ventaja, y la capa de polisacáridos alrededor de la bacteria la protege de inhibiciones por tóxicos. Por lo anterior, los sistemas de biopelículas podrían ser más adecuados para el tratamiento de los colorantes azo (Bishop, 1996).

2.1.1. Legislación aplicada a la industria textil en México

La Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente regula en materia ambiental todas las descargas de aguas residuales a ríos, cuencas, aguas marinas y demás depósitos o corrientes de agua, mediante Normas que establecen los límites máximos de contaminantes permisibles para cada descarga, a fin de asegurar una calidad de agua satisfactoria para el bienestar de la población y el equilibrio ecológico (Ilangovan, 1996).

En el caso de la industria textil, se debe tener en cuenta el cumplimiento de la antigua Norma Oficial Mexicana NOM-CCA-014-ECOL/1993; la cual indicaba los límites máximos de contaminantes

permisibles en las descargas de aguas residuales provenientes de la industria textil (Tabla 2.1); además de estos parámetros, se incluía el color y tóxicos orgánicos, para los cuales se podrían establecer límites máximos permisibles si se consideraba necesario (SEMARNAP, 1994). En relación con el color, se recurría a la Norma Oficial Mexicana NOM-AA-45-1981, donde se estipulaba la metodología para la determinación de color en el agua, pero sin precisar ningún límite ni considerar a los compuestos intermediarios que podrían generarse como las aminas aromáticas, que se originan durante la degradación parcial de los colorantes azo. Respecto a los tóxicos orgánicos, en el Anexo A de la Norma Oficial Mexicana NOM-CCA-001-ECOL/1993, se presentaba una lista de los compuestos orgánicos considerados como tóxicos; sin embargo, en dicha lista no se indica ningún tipo de amina aromática (SEMARNAP, 1993).

TABLA 2.1. Norma Oficial Mexicana NOM-CCA-014-ECOL/1993 (ahora sustituida por la NOM-001-ECOL-1996 y la NOM-002-ECOL-1996)

PARÁMETROS	LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES (PROMEDIO)	
	DIARIO	INSTANTÁNEO
Valor de pH	6-9	6-9
Demanda bioquímica de oxígeno (mg/L)	100	120
Demanda química de oxígeno (mg/L)	200	240
Sólidos sedimentables (ml/L)	1.0	1.2
Grasas y aceites (mg/L)	20	30
Sólidos suspendidos totales (mg/L)	100	120
Cromo total (mg/L)	1.0	1.2
Sulfuros (mg/L)	0.2	0.4
Fenoles (mg/L)	0.1	0.2

FUENTE: SEMARNAP, 1994

Posteriormente, aparecieron la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996 y la Norma Oficial Mexicana NOM-002-ECOL-1996, que sustituirían a la Norma Oficial Mexicana NOM-CCA-014-ECOL/1993. La nueva legislación ya no considera el color de las aguas, por lo que los colorantes azo están sin regulación a pesar de su potencial toxicidad.

Debido a dicha deficiencia en la legislación mexicana en materia ambiental para el control de la descarga de aguas residuales de la industria textil, los desarrollos tecnológicos para el tratamiento de tales aguas residuales deben asegurar, mediante una detallada investigación bioquímica, que realmente se descarga un agua residual sin compuestos tóxicos agresivos al ambiente como una contribución de este sector al bienestar social.

2.1.2. Legislación aplicada a la industria textil en otros países

La legislación aplicada a los colorantes azo en otros países inició durante la década de los setenta, cuando se reunió la suficiente información sobre sus efectos tóxicos, que incluyen diferentes tipos de cáncer en mamíferos y alteraciones del metabolismo bacteriano. En 1974, la asociación ecológica y

toxicológica de las industrias manufactureras de colorantes (ETAD por sus siglas en inglés) con sede en Suiza, inició la elaboración de una base de datos toxicológica, ecotoxicológica y sistemática, que incluía a todos los colorantes comerciales (Anliker y col., 1988). En la Tabla 2.2 se muestra la compilación de todos los colorantes que fueron clasificados como tóxicos por dicha asociación en 1986.

TABLA 2.2. Lista de colorantes considerados como tóxicos por la asociación ecológica y toxicológica de las industrias manufactureras de colorantes

NOMBRE GENÉRICO ^a	NÚMERO ^a
Anaranjado ácido 156	26501
Anaranjado ácido 165	28682
Azul básico 3	51004
Azul básico 7	42595
Azul básico 81	42598
Rojo básico 12	48070
Violeta básico 16	48013
Amarillo básico 21	48060
Anaranjado directo 62	No disponible
Diazo azoico, componente 20	37175
Diazo azoico, componente 24	37155
Diazo azoico, componente 41	37165

FUENTE: Anliker y col., 1988

a. Nombre genérico y número del colorante en el Colour Index

Posteriores estudios sobre la toxicidad de los colorantes guiaron a la prohibición de ciertos colorantes por algunos gobiernos, principalmente europeos. Las legislaciones ambientales holandesa y alemana han regulado el uso de los colorantes azo debido a que las aminas aromáticas, que se generan cuando el colorante es degradado parcialmente en el ambiente, es decir, cuando se rompe el enlace azo, están prohibidas porque pueden causar cáncer en la piel cuando los períodos de contacto son largos (<http://www.kommanet.nl/demo/ne020996.html>).

A partir del 1 de agosto de 1996, el Estado holandés a través del Ministerio de Asuntos Económicos y la Secretaría de Salud Pública, Bienestar y Deportes, ha decidido decretar como prohibida la distribución y uso de un número específico de aminas aromáticas carcinogénicas que, subsecuentemente, se aplica a los colorantes azo que podrían generar algunas de las aminas aromáticas prohibidas (<http://www.kommanet.nl/demo/ne020996.html>).

Por otra parte, el 15 de julio de 1994, el Gobierno alemán promulgó una nueva regulación, que prohibía la manufactura, importación o venta de textiles y ropa, que contenga ciertos colorantes azo dañinos, considerándose con esta característica a todos los azocompuestos que bajo condiciones reductoras pueden romperse y generar alguna de las 20 aminas aromáticas carcinogénicas especificadas en la ley (ver Tabla 2.3). Sin embargo, la nueva regulación no especificaba ningún

método oficial ni límite de control. A pesar de lo anterior, esta regulación fue vigente a partir del 1 de enero de 1995 (<http://cwis.polyu.edu.hk/~itc/vrspilot.htm>).

TABLA 2.3. Lista de las aminas aromáticas prohibidas por la legislación alemana a partir de 1995

AMINA AROMÁTICA	
4-aminobifenil	3,3'-dimetoxibencidina
Benzidina	3,3'-dimetilbencidina
4-cloro-o-toluidina	3,3'-dimetil-4,4'-diamino difenilmetano
2-naftilamina	p-cresidina
o-aminoazotolueno	4,4'-metileno-bis-(2-cloranilina)
2-amino-4-nitrotolueno	4,4'-oxidianilina
p-cloranilina	4,4'-tiodianilina
2,4-diaminoanisol	o-toluidina
4,4'-diaminodifenilmetano	2,4-toluilenediamina
3,3'-diclorobencidina	2,4,5-trimetilanilina

FUENTE: <http://www.blla.org.uk/html/legislation/german-azo.shtml>, 2000

En el contexto de la Unión Europea, los diferentes países buscaron tener una legislación común en materia de regulación de colorantes azo, por lo que decidieron basarse, principalmente, en las legislaciones holandesa y alemana para unificar la ley (<http://www.tdctrade.com/alert/eu9906.htm>). Sin embargo, no se ha logrado definir el método para evaluar la toxicidad de un colorante azo y existen discrepancias en relación con la aplicación de la ley a los pigmentos azo con los mismos criterios que a los colorantes azo (<http://www.blla.org.uk/html/legislation/german-azo.shtml>).

2.2. GENERALIDADES SOBRE COLORANTES

2.2.1. Clasificación y características de los colorantes

Comúnmente, los compuestos usados en la coloración de materiales como fibras, papel, plásticos y pinturas, se clasifican como colorantes y pigmentos, basándose en su solubilidad y mecanismo de enlace al material. Los primeros son generalmente solubles en agua y tienen alta afinidad por el material que colorean, mientras que los pigmentos se consideran insolubles y requieren agentes químicos conocidos como mordentes para fijarse a los materiales.

Los colorantes a su vez pueden clasificarse por su estructura, por el método de aplicación o por su utilización en la industria. Esta última clasificación viene dada por sus propiedades y tal como se muestra en la Tabla 2.4 se dividen en cuatro grupos con características bien definidas (García, 1996).

La clasificación sobre la base de su estructura química se fundamenta en las teorías clásicas del color y en el concepto de grupo cromóforo, el Colour Index (1971) los divide en 29 grupos.

Particularmente, los colorantes azo son subclasificados basándose en el número y arreglo de los grupos azo presentes (monoazo, diazo, etc).

TABLA 2.4. Clasificación y propiedades de los colorantes

TIPO	PROPIEDADES	APLICACIONES
<u>ÁCIDO</u>	ANIÓNICOS Y SOLUBLES EN AGUA DEBIDO A LA PRESENCIA DE GRUPOS HIDROXILO. GRUPO CROMÓFORO CARACTERÍSTICO -SO ₃ H. INCLUYEN COLORANTES TIPO AZO	TINCIÓN DE LANA, PIEL, NYLÓN Y ACRILANES MODIFICADOS. USADOS EN MENOR PROPORCIÓN PARA COSMÉTICOS Y ALIMENTOS
<u>BÁSICO</u>	CATIÓNICOS Y SOLUBLES EN AGUA. POSEEN GRUPOS AMINO QUE LES DAN UN CARÁCTER CATIÓNICO EN SOLUCIÓN ÁCIDA DILUIDA. INCLUYEN DERIVADOS DE DIFENILMETANO Y TRIFENILMETANO PRINCIPALMENTE	TINCIÓN DE ACRÍLICOS, NYLÓN Y POLIÉSTER MODIFICADO, AUNQUE SE USAN POCO EN LA INDUSTRIA TEXTIL
<u>DIRECTO</u>	ANIÓNICOS E HIDROSOLUBLES DEBIDO A LA PRESENCIA DE GRUPOS SULFÓNICOS. CASI TODOS SON TIPO AZO	TINCIÓN DE ALGODÓN, CELULOSA, PAPEL, PIEL Y FIBRAS COMO LINO, CÁÑAMO, SEDA Y LANA
<u>DISPERSO</u>	NO ANIÓNICOS E INSOLUBLES EN AGUA. INCLUYEN DERIVADOS DE ANTRAQUINONA Y DE TIPO AZO	TINCIÓN DE POLIÉSTER, NYLÓN, ACETATO DE CELULOSA Y FIBRAS ACRÍLICAS

FUENTE: García, 1996

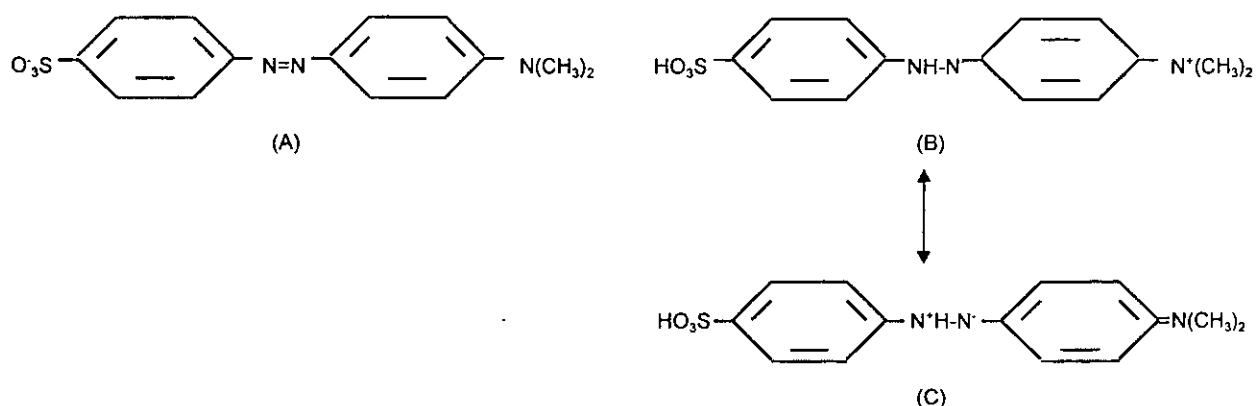
2.2.2. Color y constitución química

Los colorantes dan color a los materiales porque absorben selectivamente algunas longitudes de onda que inciden en la superficie del material y reflejan otras longitudes en forma de un color visible. Aunque todos los compuestos orgánicos absorben radiación, sólo los llamados cromóforos (nitro, nitroso, azo y quinoides entre otros) absorben dentro del intervalo de radiación sensible para el ojo humano.

El color es el resultado directo del espectro de absorción visible, que está estrechamente relacionado a la estructura molecular, grado de agregación y efecto del medio ambiente. El espectro de un colorante es afectado por interacciones electrónicas con cualquier otra molécula con la que pueda estar asociado mediante enlaces de hidrógeno, interacciones dipolares, efecto dieléctrico (particularmente con colorantes iónicos), efecto estérico o cristalización.

La mayoría de los colorantes se presentan como estructuras resonantes con una distribución de valencia dentro de las moléculas, lo cual determina que la estructura sea colorida. En el caso de los colorantes azo, específicamente anaranjado de metilo, en solución básica existe en la forma A, que se muestra en la Figura 2.1, en donde la resonancia está restringida a los cambios de valencia dentro del anillo bencénico; la adición de ácido ocasiona un exceso de iones hidrógeno que convierten a la molécula en la estructura B, que es altamente colorida a causa de la resonancia entre B y C que permiten la redistribución de las valencias más significativamente (García, 1996).

FIGURA 2.1. Estructura de resonancia del colorante azo anaranjado de metilo



FUENTE: García, 1996

2.2.3. Síntesis de colorantes azo

Entre los diferentes compuestos orgánicos, existen aquellos de origen natural, como la lignina y los que son producto de la síntesis química (pertenecientes al grupo de los compuestos xenobióticos), entre los cuales se encuentran los colorantes azo.

La síntesis de colorantes azo consiste en dos procesos. En el primero, denominado diazonización, una amina aromática es convertida en el correspondiente cloruro de diazonio; el segundo paso es un acoplamiento, que involucra la conversión de la sal de diazonio a un compuesto azo mediante la reacción con un compuesto aromático, el cual generalmente es un sustituyente del anillo aromático (fenólico, amino o grupo amino sustituido) que actúa como un fuerte donador electrónico (Figura 2.2).

FIGURA 2.2. Reacciones químicas para la síntesis de colorantes azo

1) Diazonización (síntesis de sales de diazonio):



2) Acoplamiento (cópula):



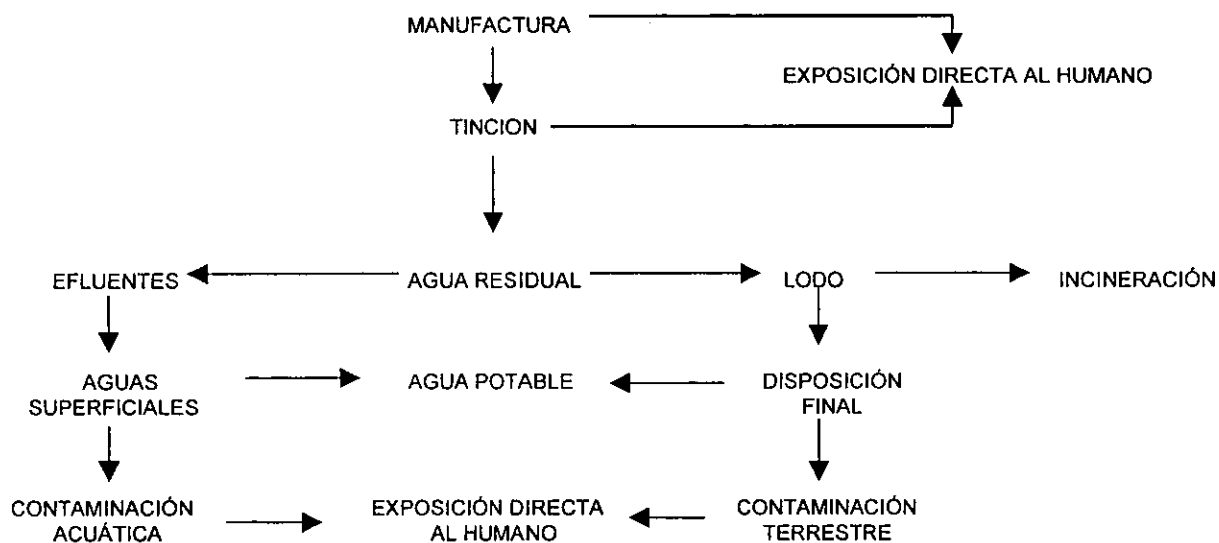
Ar = COMPUESTO AROMÁTICO.

FUENTE: Bishop, 1996

2.2.4. Los colorantes en el ambiente

La presencia de colorantes tipo azo en el ambiente genera una serie de problemas relacionados con su toxicidad y el grado de exposición a que estén sometidos diferentes seres vivos, principalmente humanos, lo cual se agrava por el carácter xenobiótico y recalcitrante de dichos colorantes. La exposición humana directa a los colorantes ocurre en las plantas manufactureras y distribuidoras de colorantes, mientras que la exposición indirecta, sin considerar los colorantes usados como aditivos alimenticios, se da en menor grado mediante las cadenas alimenticias terrestres y acuáticas (ver Figura 2.3).

FIGURA 2.3. Rutas seguidas por los colorantes en el ambiente



FUENTE: Motschi, 1994

Los colorantes contenidos en las aguas residuales (10% de la producción mundial, aproximadamente) pasan a las plantas de tratamiento donde son eliminados en gran medida por la adsorción del lodo, posteriormente los lodos son incinerados o dispuestos en basureros controlados.

Aunque la adsorción del colorante por lodos activados puede ser un importante proceso de eliminación, éste depende de factores relacionados con la naturaleza química del colorante como la masa molecular, los grupos funcionales y la carga eléctrica entre otros.

El colorante que no sea adsorbido y resista el tratamiento biológico será vertido al ambiente con el agua tratada, lo que provoca la contaminación de los ecosistemas acuáticos y terrestres, donde persiste como compuesto recalcitrante afectando a las comunidades microbianas y, por ende, a todas las cadenas tróficas. Con relación a los colorantes tipo azo, éstos son tóxicos para las bacterias, por lo que tienden a degradar parcialmente el colorante hasta las respectivas aminas aromáticas, las cuales son menos tóxicas para los procariones, pero son cancerígenas para los mamíferos, quienes pudieran ser expuestos a estas aminas a través de las cadenas tróficas y la contaminación del agua subterránea y superficial.

2.2.5. Toxicidad de los colorantes azo

Aunque muchos colorantes azo normalmente no tienen efectos citotóxicos, mutagénicos o carcinogénicos, en mamíferos, las aminas aromáticas producidas al romper el enlace azo podrían tenerlos. Existen varios reportes sobre carcinogénesis y mutagénesis en animales de laboratorio por exponerlos a diversas aminas aromáticas. Tal es el caso de los colorantes azo ampliamente usados en la manufactura de colorantes, tinción textil y la industria del cuero que generan bencidina al ser reducidos. Estos colorantes han sido estudiados epidemiológica y experimentalmente en diversos animales, resultando que son carcinógenos para la vejiga urinaria humana y originan tumores en una gran variedad de animales (Chung y Cerniglia, 1992). Actualmente las legislaciones holandesa y alemana han prohibido, desde 1996, el uso de los colorantes azo para cualquier actividad, inclusive su importación.

Con relación a los microorganismos degradadores, el colorante intacto es más tóxico que las aminas aromáticas originadas por la reducción del mismo. Se ha observado que el colorante azo anaranjado ácido 7 intacto inhibió el proceso de nitrificación realizado por *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*, sin afectar el crecimiento de dichos géneros bacterianos (He y Bishop, 1991). Por otra parte, se reportó que el ácido sulfanílico, que es producto de la reducción del enlace azo de los colorantes anaranjado I y II, interfiere con su completa mineralización (Kulla y col., 1983).

2.3. BIODEGRADACIÓN DE COMPUESTOS XENOBIÓTICOS

Los compuestos xenobióticos son sustancias extrañas a los sistemas biológicos debido a que no han sido expuestos a ellos en el curso de la evolución y en consecuencia tienden a no ser biodegradables, por lo que se acumulan en el ambiente (Hutzinger y Veerkamp, 1981). Tales compuestos que no son biodegradables y persisten en el ambiente son denominados resistentes; la resistencia de los compuestos xenobióticos es muy variada. Un ejemplo de dicha variabilidad lo constituye el *p*-clorofenol que tiene una vida media de tres días, mientras que la vida media del DDT es de varios meses. En la Tabla 2.5 se mencionan algunos grupos de compuestos con diferente resistencia a la degradación microbiana (Leahy y Brown, 1994).

TABLA 2.5. Grado de biodegradabilidad de algunos compuestos xenobióticos

FÁCILMENTE DEGRADABLES	MODERADAMENTE DEGRADABLES	DIFÍCILMENTE DEGRADABLES
TOLUENO BENCENO ALCOHOL ISOPROPÍLICO METANOL CETONAS FENOLES ACRILONITRILO COMBUSTIBLE DIESEL <i>p</i> -CLOROFENOL	ACEITE CRUDO ACEITES LUBRICANTES CARBÓN DE HULLA CREOSOTAS PENTACLOROFENOL NITROBENCENO ANILINA CADENAS ALIFÁTICAS LARGAS FTALATOS	TRICLOROETANO CLORUROS DE VINILO BIFENILOS POLICLORADOS (BPC) DDT CLORDANO HEPTACLORO

FUENTE: Leahy y Brown, 1994

El carácter resistente de un compuesto está directamente relacionado con los factores que influyen en la velocidad y grado de degradación en un ambiente dado. Entre tales factores se encuentran los ambientales, que influyen evitando el crecimiento de microorganismos, disminuyendo la disponibilidad del compuesto e incluso modificando la expresión genética y las propiedades fisicoquímicas de los compuestos y que definen su comportamiento en los ecosistemas (Singleton, 1994). En la Tabla 2.6 se muestran algunas características asociadas tanto al ambiente como a los compuestos, que afectan la biodegradación de éstos últimos.

TABLA 2.6. Características asociadas al ambiente y a los compuestos que afectan su biodegradabilidad

ASOCIADOS A LOS COMPUESTOS	ASOCIADOS AL AMBIENTE
<ul style="list-style-type: none"> • TAMAÑO MOLECULAR, FORMA, CARGA Y GRUPOS FUNCIONALES • COMPOSICIÓN IÓNICA, CONCENTRACIÓN, SOLUBILIDAD Y VOLATILIZACIÓN • CONVERSIÓN EN PRODUCTOS QUE INTERFIEREN CON EL METABOLISMO DE LOS MICRO-ORGANISMOS DEGRADADORES • MAL INDUCTOR DE LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE • POCO SUCEPTIBLE AL ATAQUE INICIAL PORQUE NO EXISTEN ENZIMAS ADECUADAS O ÉSTAS SON MUY ESPECÍFICAS 	<ul style="list-style-type: none"> • EL MATERIAL ES FÍSICAMENTE INACCESIBLE • pH, pO₂, TEMPERATURA Y POTENCIAL REDOX • PRESENCIA DE INTERFASES • AUSENCIA DE MICROORGANISMOS APROPIADOS PARA LA DEGRADACIÓN (PERMEABILIDAD Y MECANISMOS ENZIMÁTICOS) • DEFICIENCIA DE NUTRIMENTOS ESENCIALES, COMETA-BOLITOS, RADICALES REACTIVOS O PRESENCIA DE OTROS COMPUESTOS ORGÁNICOS E INORGÁNICOS • CALIDAD E INTENSIDAD DE LA LUZ

FUENTE: Fewson, 1988

La negrilla indica lo que afecta la biodegradabilidad de los colorantes azo

Aunque no existe una característica única que pueda definir el grado de resistencia de un compuesto, se puede mencionar un conjunto de características que dificultan su biodegradación: a) Polimerización o ramificación del compuesto; b) Componentes estables que están unidos por enlaces que pueden no ser fácilmente hidrolizados o escindidos; c) Presencia de residuos policíclicos, aromáticos o enlaces éter y d) Presencia de residuos cloruro, nitro y sulfato (especialmente cuando se encuentran en la posición *meta* del anillo bencénico o en casos de sustitución múltiple). La importancia relativa de estas características para la biodegradación depende del microorganismo y de las condiciones ambientales particulares en cada caso. Algunas propiedades como tamaño, grado de ramificación e hidrofobicidad afectan la concentración que puede alcanzar el compuesto en la solución, la accesibilidad al ataque enzimático y el transporte celular; mientras que el tipo de enlace, grado de sustitución y carga afectan la posibilidad de que el compuesto sea usado como sustrato de las enzimas o proteínas de transporte (García, 1996).

2.3.1. Microorganismos degradadores de compuestos xenobióticos

Los problemas ambientales asociados a la acumulación de compuestos xenobióticos han generado un gran interés por identificar microorganismos capaces de degradarlos. Actualmente se conocen varios grupos, que incluyen bacterias y hongos; en la Tabla 2.7 se indican los microorganismos degradadores más ampliamente estudiados, incluyendo también los compuestos que pueden

degradar. Aunque algunas bacterias pueden degradar una amplia variedad de contaminantes orgánicos, por lo general se requiere de la participación de diversos grupos bacterianos y fúngicos que forman consorcios para completar la degradación de los compuestos, la existencia de estas asociaciones o consorcios bacterianos es la principal razón que dificulta el aislamiento de las bacterias involucradas en la biodegradación de compuestos xenobióticos como los colorantes azo, además de los largos tiempos de duplicación y los requerimientos de estricta anaerobiosis.

TABLA 2.7. Microorganismos degradadores de compuestos xenobióticos

MICROORGANISMO	COMPUESTO XENOBIÓTICO
<p><u>BACTERIAS</u></p> <p>Metanótrofos <i>Escherichia y coli</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Methylobacter</i> sp. <i>Methylococcus</i> sp. <i>Flavobacterium</i> sp. <i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Cunninghamella elegans</i> <i>Mycobacterium</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Acinetobacter</i> sp. <i>Mycobacterium</i> sp. <i>Candida</i> sp. <i>Anthrobacter</i> sp. <i>Alcaligenes xylooxidans</i> <i>Nocardia</i> sp.</p> <p><u>HONGOS</u></p> <p>Hongos de la pudrición blanca <i>Phanerochaete chrysosporium</i></p>	<p>PENTAFLOROFENOL, COMPUESTOS BTEX: BENCENO, TOLUENO, ETILBENCENO Y XILENOS TRICLOROETANO TRICLOROETANO. DISOLVENTES CLORADOS DISOLVENTES CLORADOS DISOLVENTES CLORADOS PENTAFLOROFENOL HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS Y CLOROBENZOATO HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS Y CLOROBENZOATOS ACIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO CLOROBENZOATOS</p> <p>HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS PENTAFLOROFENOL, PENTAFLOROFENOL, INSECTICIDAS DE ALQUIL HALUROS Y COMPUESTOS BTEX: BENCENO, TOLUENO, ETILBENCENO Y XILENOS</p>

FUENTE: Leahy y Brown, 1994; Singleton, 1994

Se han identificado diversos microorganismos capaces de degradar compuestos xenobióticos resistentes. En algunos casos, la biodegradación es total hasta la producción de CO₂ y agua; este proceso es llamado mineralización; en otras transformaciones se producen diversos productos que pueden ser utilizados como sustratos por otros microorganismos o tener efectos tóxicos. Durante dichos procesos, los desechos orgánicos y algunos inorgánicos pueden ser absorbidos por los microorganismos y rotos internamente o ser degradados externamente mediante enzimas catabólicas secretadas, las cuales generan metabolitos que son absorbidos y utilizados internamente.

2.3.2. Cometabolismo en la degradación de compuestos xenobióticos

Las enzimas catabólicas microbianas, producidas para la utilización de nutrimentos naturales, pueden degradar algunos desechos cuando éstos se encuentran presentes. Este fenómeno se denomina cometabolismo, en este proceso el cometabolito no sirve como fuente de carbono y energía (no es donador de electrones, solo aceptor), ni es nutrimento esencial debido a la naturaleza de su

estructura molecular, lo que implica que no induce las enzimas requeridas para su catabolismo o no existen tales enzimas. Sin embargo, si el cometabolito es un compuesto aromático, el rompimiento del anillo hace posible su asimilación como fuente de carbono (Adriaens y Hickey, 1994). En la Tabla 2.8 se muestran los cometabolitos que pueden ser utilizados como sustratos primarios, es decir, que sostienen el crecimiento por que son donadores de electrones y, aquellos que no lo hacen, ya que sólo son aceptores de electrones.

TABLA 2.8. Procesos biológicos y condiciones ambientales bajo las cuales las bacterias podrían transformar ciertos compuestos orgánicos

PROCESOS	EJEMPLOS DE COMPUESTOS	
	HALOGENADOS	NO HALOGENADOS
SUSTRATOS PRIMARIOS:		
AEROBIOS	Clorobenceno, mono- y diclorobenzoatos, mono-, di- y pentaclorofenoles, monoclorobifenilos, 2,4-D, 2,4,5,-T dibenzo-p-dioxina, dibenzofurano, ácidos alifáticos clorados	Benceno, benzoato, compuestos BTEX, hidrocarburos saturados e insaturados, naftaleno y componentes del creosote
ANAEROBIOS	Clorobencenos, diclorofenoles y diclorometano	Compuestos BTEX, fenol e hidrocarburos alifáticos insaturados
COMETABOLITOS:		
OXIDACIONES	Di- y triclorobenzoatos, di- a través de bifenilos pentaclorados, dioxinas y furanos mono- di- y tetraclorados, cloronaftaleno, tricloroetileno, dicloroetileno y cloruro de vinilo	Hidrocarburos alifáticos de cadena larga y alifáticos ramificados y algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos (antraceno y benzoantraceno)
REDUCCIONES	Di-, tri-, tetra- y hexaclorobencenos, clorobenzoatos, cloroanilinas, DDT, di- a través de bifenilos heptaclorados, dioxina heptaclorada, lindano, tetracloruro de carbono y tricloroetano	Hidrocarburos aromáticos policíclicos e hidrocarburos alifáticos

FUENTE: Adriaens y Hickey, 1994

En condiciones aerobias, la biodegradación de compuestos xenobióticos se realiza mediante vías como la de los catecoles y la β -oxidación con la participación de oxigenasas y deshidrogenasas; mientras que en condiciones anaerobias, las enzimas involucradas en el metabolismo de xenobióticos son frecuentemente incapaces de catalizar la completa biodegradación de los sustratos y sólo realizan degradaciones parciales. El intervalo de reacciones catabólicas en ambientes anaerobios está restringido a las siguientes reacciones: Hidrogenaciones, deshidrogenaciones, hidrataciones, deshidrataciones, hidrólisis, condensaciones, carboxilaciones, descarboxilaciones, reacciones mediadas por la coenzima B₁₂ y fotorreacciones (Adriaens y Hickey, 1994).

2.4. DEGRADACIÓN DE COLORANTES AZO

La degradación de los colorantes azo dentro de un reactor o en el ambiente puede ser parcial (reducción del enlace azo) o llegar hasta la mineralización. La degradación parcial o decoloración se realiza tanto biótica como abióticamente, mientras que la mineralización se lleva a cabo sólo de manera biótica con la participación de seres vivos.

2.4.1. Degradación parcial de colorantes azo

La degradación parcial o decoloración consiste en la reducción del enlace azo y la formación de las respectivas aminas aromáticas, este fenómeno puede realizarse abiótica y bióticamente.

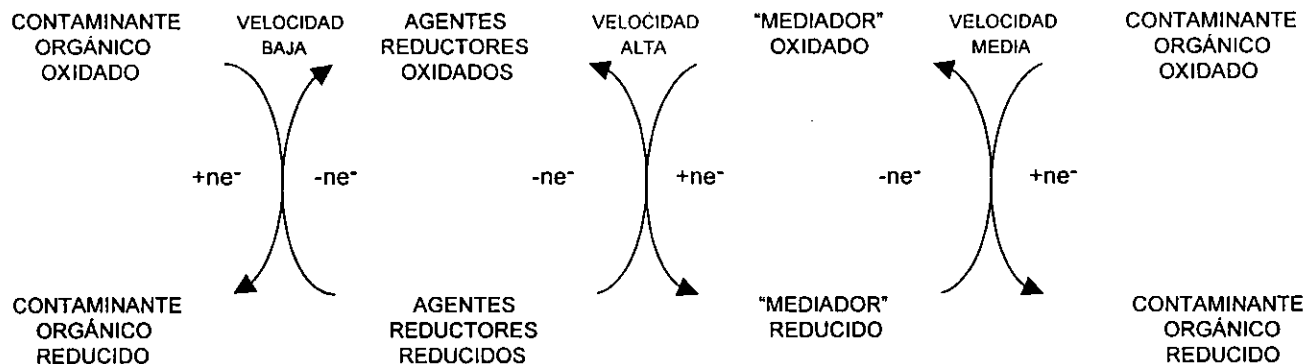
2.4.1.1. Degradación química (abiótica)

La degradación parcial de manera abiótica puede ser realizada por materia orgánica contenida en las aguas residuales, por hipoclorito de sodio diluido y por fotooxidación.

- Degradación parcial abiótica de nitroaromáticos y azocompuestos en materia orgánica

La reducción abiótica en ambientes reductores como sedimentos, acuíferos y sitios de desperdicios o desechos peligrosos ha tomado considerable interés recientemente, ya que pueden ocurrir reacciones que incluyen deshalogenación reductiva de hidrocarburos polihalogenados, reducción de compuestos aromáticos y azocompuestos. Entre los reductores naturales más abundantes en dichos ambientes anaerobios se encuentran las formas inorgánicas reducidas de hierro y sulfuro tales como óxidos de hierro II y III, carbonatos de hierro II y sulfuro de hidrógeno; diversos estudios han comprobado que estos reductores reaccionan con los contaminantes orgánicos a una velocidad muy lenta y dado que tales transformaciones en los sistemas naturales son más rápidas, se piensa que en dichos sistemas hay agentes reductores muy reactivos pero poco abundantes que juegan un importante papel como "mediadores" en la transferencia de electrones (ver Figura 2.6).

FIGURA 2.6. Representación conceptual del sistema de reducción abiótica en condiciones anaerobias



FUENTE: Dumnivant y col., 1992

El esquema muestra cómo el mediador es rápidamente reducido por los agentes reductores abundante y posteriormente éste puede reducir a los contaminantes orgánicos a una velocidad media o moderada; los mediadores podrían ser compuestos tipo quinona y una variedad de metales de transición acomplejados, que pueden ser parte de la materia orgánica y son bien conocidos como contituyentes de los sistemas de transferencia de electrones biológicos. Entre las sustancias que han sido estudiadas como mediadores se encuentran las hidroquinonas y ferro-porfirinas.

Estudios realizados por Dunnivant y col. (1992) han comprobado la reducción de azocompuestos y compuestos nitroaromáticos mediante agentes reductores contenidos en la materia orgánica de 10 diferentes tipos de aguas, que fueron seleccionadas con base en su capacidad para reducir compuestos nitroaromáticos sustituidos. La reducción de estos compuestos hasta las correspondientes anilinas en condiciones anaerobias dependió de los valores de pH y de E_h del sistema y de los sustituyentes presentes en los compuestos.

Respecto a los valores de pH y de E_h , existe una relación entre éstos y la cantidad de compuestos reducidos en la materia orgánica; la tendencia es que a mayores valores de pH aumenta la cantidad de compuestos reducidos en la materia orgánica (aunque algunas quinonas no se comportan de esta manera) y conforme es más negativo el potencial redox E_h , habrá más componentes de la materia orgánica reducidos, los cuales aumentarían la reducción de los compuestos nitroaromáticos. Se especula que a un valor de pH de 7 y uno de E_h próximo a -0.3 V, todas las estructuras tipo quinona están reducidas.

En relación con los sustituyentes, los cloruros y acetilos en posición *para* con el grupo nitro favorecieron la reducción más que sus correspondientes en las posiciones *orto* y *meta*; el grupo metil en cualquier posición disminuyó la velocidad de reducción.

Cabe mencionar que la hidrofobicidad de los compuestos no parece ser un factor determinante, aunque se piensa que tal hidrofobicidad puede incrementar la adsorción del compuesto por el sedimento no reactivo de la materia orgánica.

En conclusión, se puede mencionar que bajo condiciones redox típicas para la reducción de sulfatos y comunes en ambientes metanogénicos, donde los potenciales de reducción están por debajo de -0.2 V, la reducción abiótica de compuestos nitroaromáticos por compuestos reducidos, que forman parte de la materia orgánica natural de diversas fuentes, podría constituir un importante proceso de transformación.

- Degradación parcial abiótica de colorantes azo en solución diluida de hipoclorito de sodio

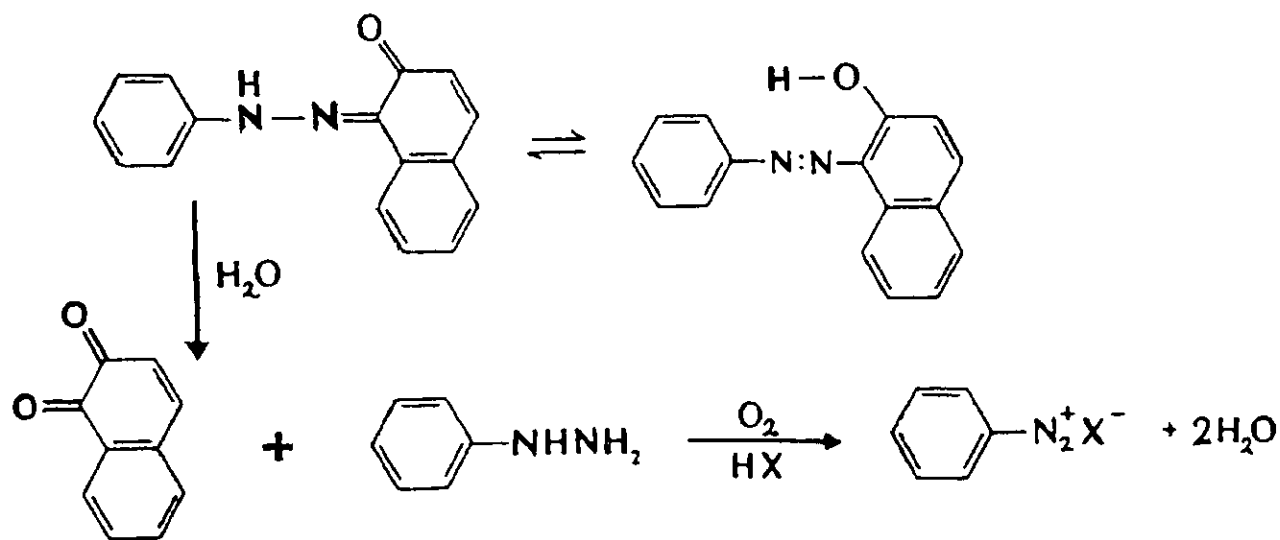
El teñido de artículos de algodón podría requerir de un lavado en la presencia de agentes blanqueadores y uno de los más importantes es el hipoclorito de sodio; por lo que una de las propiedades de los colorantes para celulosa es la resistencia a la degradación por dicho agente.

Los primeros trabajos realizados por Schmidt, en 1912 (en Gregory y Stead, 1978), quien probó la reacción del azocompuesto *p*-hidroxiazo-benceno con cloruro, bromuro y ácido hipocloroso, se observó que el componente diazo (cloruro de bencenodiazonio) fue regenerado y el componente acoplante fue convertido a su derivado halogenado (2,4,6-triclorofenol). Posteriormente, Seyewertz y Chaix (1927) y Shilov y Minaev (1936) observaron lo mismo que Schmidt en cuanto al componente diazo regenerado, pero hubo discrepancias en relación con el componente acoplante (en Gregory y Stead, 1978). Más tarde, Desai y Giles, en 1949 (en Gregory y Stead, 1978), propusieron un mecanismo general para la oxidación de compuestos hidroxiazo, postulando que la reacción ocurre en la forma hidrazona, produciendo una quinona y una fenilhidrazina, la cual es después oxidada para formar una sal de diazonio (ver Figura 2.7).

Las reacciones de los diferentes colorantes azo con hipoclorito de sodio en agua a valor de pH de 7 mostraron un marcado efecto de los sustituyentes en el grado de degradación parcial, estando involucrados efectos tanto estéricos como electrónicos. La importancia del efecto estérico fue

evidente por el decremento en los niveles de degradación parcial producidos por prácticamente todos los sustituyentes localizados en la posición *orto* en relación al grupo azo. Los efectos electrónicos se observaron en los sustituyentes localizados en las posiciones *meta* y *para* respecto al enlace grupo azo. En general, los sustituyentes que aceptan electrones disminuyen los niveles de degradación parcial y los que donan electrones aumentan los niveles (particularmente, cuando éstos se localizan en la posición *para* relativa al grupo azo). En derivados de la anilina el grupo sulfonato tuvo un efecto significativo cuando se localizó en la posición *orto* respecto al grupo azo.

FIGURA 2.7. Esquema del mecanismo general para la oxidación de compuestos hidroxiazos

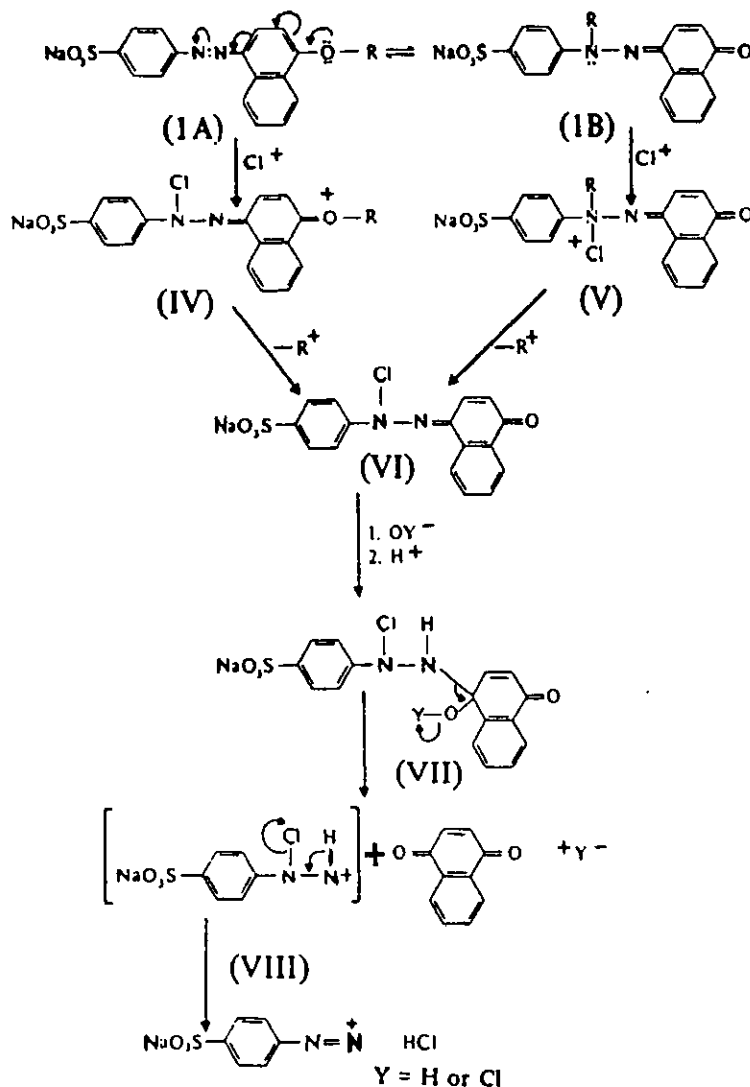


FUENTE: Gregory y Stead, 1978

Para demostrar un posible ataque inicial sobre el átomo de nitrógeno de la forma hidrazona por especies cargadas positivamente se seleccionaron dos colorantes, los cuales mostraron una degradación parcial instantánea en condiciones ácidas cuando se determinaron sus vidas medias durante la reacción con hipoclorito de sodio a diferentes valores de pH. Conforme el pH se volvió alcalino, la degradación parcial disminuyó; el efecto del pH se debe al ión cloro (electrofílico), que es pH-dependiente en relación con su concentración, la cual decrece conforme aumenta el pH.

Estos resultados mostraron la mayor susceptibilidad al ataque de la forma hidrazona que de la forma azo, por lo que se propusieron los mecanismos de degradación parcial que se muestran en la Figura 2.8.

FIGURA 2.8. Mecanismos propuestos para la de degradación parcial de colorantes azo en solución diluida de hipoclorito de sodio



FUENTE: Gregory y Stead, 1978

- Degradación parcial abiótica de colorantes azo por fotooxidación

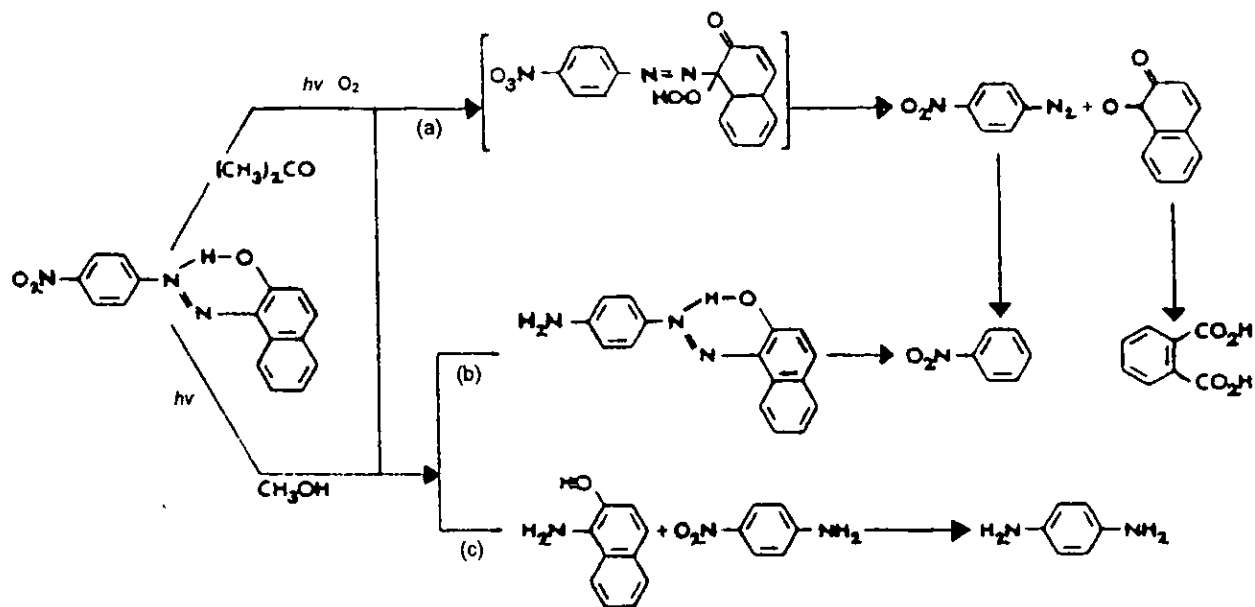
A principios de los ochenta se realizaron estudios que comprobaron la participación del singulete de oxígeno durante la fotooxidación de algunos colorantes azo; Griffiths y Hawkins, en 1972 (en Kuramoto y Kitao, 1982), reportaron la sensibilidad a la fotooxidación del colorante 4-arylazo-1-naftol y sus análogos mediante un mecanismo del singlete oxígeno. Posteriormente, Kuramoto y Kitao (1982) realizaron experimentos usando colorante azo de las series 2-arylazonaftoles y fenilazopirazolones diluidos en un solvente orgánico como metanol, acetona o benceno, con o sin rosa de Bengala, azul de metileno, 1,4-diazabicyclo (2,2,2) octano (DABCO), dimetilditiocarbamato de níquel (NMC), β -

caroteno o 2,6-di-*t*-butil-*p*-cresol en una solución saturada de aire, que fue colocada en frascos equipados con termómetro, condensador y agitador magnético, para ser irradiados con una lámpara de mercurio de 100 W a 23-25°C.

Los resultados indicaron que el grado de fotooxidación del colorante azo fue acelerado en presencia de sensibilizadores como azul de metileno y rosa de Bengala, mientras que al agregar DABCO, un eficiente quelante del singlete oxígeno, el grado de fotooxidación fue retardado y se recuperó más del 90% del colorante no reactivo, concluyendo que el colorante en solución se vuelve sensible a la fotooxidación.

Al examinar el efecto de los sustituyentes sobre la fotooxidación de los 1-(*p*-sustituidos-fenilazo)-2-naftoles en metanol saturado de aire irradiado se observó que, a excepción del grupo nitro, la resistencia a la luz de estos colorantes depende de la densidad electrónica de los átomos de nitrógeno en el grupo azo y que el grado relativo de fotooxidación se incrementa por los sustituyentes donadores de electrones en el anillo arilo. La fotooxidación del colorante 1(*p*-nitrofenilazo)-2-naftol en etanol o metanol mostró un comportamiento anormal, ya que junto con los productos de la oxidación, que fueron nitrobenzenu, ácido ftálico y su éster, también se formaron productos de fotorreducción (grupos azo y nitro), siendo éstos anilina, *p*-nitroanilina, 1-amino-2-naftol y 1-(*p*-aminofenilazo)-2-naftol. En 2-propanol, los productos del proceso de fotorreducción se incrementaron; mientras que con acetona sólo se formaron productos de la fotooxidación (ver Figura 2.4).

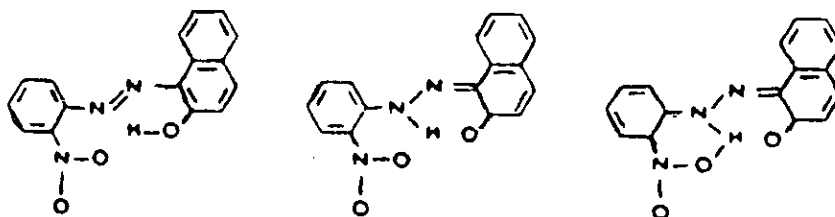
FIGURA 2.4. Fotooxidación del colorante 1-(*p*-nitrofenilazo)-2-naftol en metanol y acetona



FUENTE: Kuramoto y Kitao, 1982

Durante el análisis del efecto de los sustituyentes, observaron que los compuestos nitro en posición *orto*, tanto para la serie 2-arylazonaftol como para la serie fenilazopirazolona, son más estables a la luz y al disolvente que los correspondientes compuestos nitro en posición *para*. Un fenómeno similar se encontró con otros azocompuestos en solución diluida de hipoclorito de sodio. Dicha estabilidad podría deberse a una posible interacción entre los grupos *o*-nitro y azo para formar un puente de hidrógeno, tal como se representa en la Figura 2.5.

FIGURA 2.5. Interacción entre los grupos *o*-nitro y azo para formar un puente de hidrógeno



FUENTE: Kuramoto y Kitao, 1982

Cabe mencionar que la fotodescomposición de colorantes azo en condiciones anaerobias, que involucra la reducción del grupo azo, ha sido descrita por Van Beek y col., a principios de los setenta (en Kuramoto y Kitao, 1982). Asimismo, se reportó la fotólisis de 1-*p*-tolilazo-2-naftol en metanol y atmósfera de nitrógeno, obteniéndose *p*-toluidina (15%), 1-amino-2-naftol y una sustancia desconocida (trazas) junto con el colorante no reactivo (52%).

2.4.1.2. Degradación parcial bioquímica

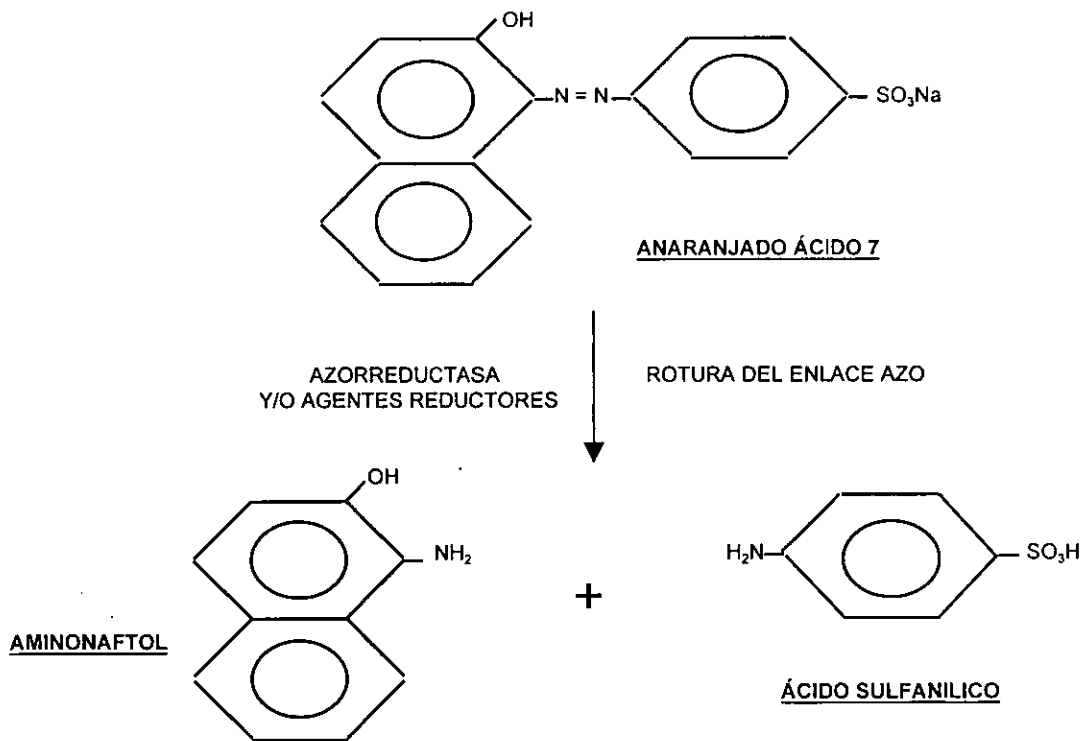
La mayoría de la información concerniente a la biodegradación anaerobia de compuestos aromáticos deriva de estudios con benzoato, describiéndose la degradación de éste bajo condiciones sulfato-reductoras y metanogénicas, ésta última puede ser completa (con fisión del anillo) o incompleta (sin fisión del anillo) (Adriaens y Hickey, 1994). En relación con los colorantes azo, éstos pueden ser parcialmente reducidos en condiciones anaerobias y aerobias mediante azoreductasas (o agentes reductores de origen biológico tales como flavinas reducidas) y peroxidasas, respectivamente. La reducción parcial a través de azoreductasas ha sido vinculada con enzimas que transfieren electrones al colorante azo, que actúa como un aceptor de electrones inespecífico (Raffi y Cerniglia, 1995). Con respecto a las peroxidasas, se ha postulado que su capacidad para reducir el enlace azo está relacionada con la similitud estructural del azocompuesto con la lignina (Paszczynsky y col., 1992). En relación con su completa mineralización, ésta rara vez se lleva a cabo en ambientes anaerobios debido a que los colorantes azo actúan como cometabolitos, es decir, se requiere de otra fuente de energía para que éstos sean asimilados; por otra parte, está bien documentada la mineralización de colorantes azo en condiciones aerobias y sistemas anaerobios-aerobios. A continuación se detallan cada uno de los procesos mencionados.

- Degradación parcial de colorantes azo mediante bacterias en anaerobiosis

Durante el proceso de reducción biótica en condiciones anaerobias, las bacterias utilizan una gran variedad de aceptores electrónicos, tales como nitrato, sulfato, dióxido de carbono, hierro y

magnesio, dependiendo de su disponibilidad y condiciones redox prevalecientes, siendo los potenciales redox y cofactores bioquímicos, tales como citocromos, corinoides y flavinas los responsables de la transferencia de electrones. Mecánicamente, se piensa que el proceso de reducción involucra la transferencia de un electrón con la formación de un radical y posterior hidrogenación del mismo; las transferencias de dos electrones ocurren menos frecuentemente. La transferencia eficiente de electrones depende mucho del potencial de reducción (ΔG°) del reductor y del sistema que transfiere los electrones (desnitrificación, sulfato-reducción o metanogénización) (Adriaens, 1994). Bajo condiciones anaerobias, muchos tipos de bacterias estrictas y facultativas pueden decolorar o degradar parcialmente el colorante azo mediante reductasas o azorreductasas, que rompen el enlace azo y forman aminas aromáticas, tales como bencidina, acetilbencidina, naftilamina y aminobifenil, dependiendo de la estructura del compuesto azo. Cabe mencionar que la participación de agentes reductores de origen biológico tales como flavinas reducidas son suficientes para la reducción del enlace azo (ver Figura 2.9).

FIGURA 2.9. Reducción (decoloración) del colorante azo anaranjado ácido 7



FUENTE: Seshadri et al., 1994

La reducción enzimática de colorantes azo por la flora microbiana ha sido ampliamente estudiada y caracterizada (ver Tabla 2.9). Se ha aislado de heces humanas una cepa de *Proteus vulgaris* capaz de reducir el colorante tartrazina; la azorreductasa implicada fue una flavoproteína específica de NADPH. Estudios cinéticos demostraron que la reducción es de orden cero cuando la concentración de las células viables permaneció constante; además, observaron que la lisis celular aceleraba la

reducción del colorante, por lo que concluyeron que el grado de reducción está influenciado por la permeabilidad (forma y carga iónica) del azocompuesto (Dubin y Wright, 1975). Scheline y col. (1970) aislaron de intestino de rata una cepa de *Streptococcus faecalis* que redujo colorantes azo, determinándose en extractos celulares que la azoreductasa implicada era una flavoproteína que preferencialmente usó NADH como donador de electrones, aunque también utilizó NADPH. Gingell y Walker (1971) encontraron que las flavinas solubles reducidas pueden actuar como donadores de electrones y estimular la reducción del colorante azo rojo 2G en *S. faecalis*; adicionalmente, observaron que el oxígeno inhibió la reducción del grupo azo, ya que las flavinas retornan a su forma oxidada. Al parecer, la reducción del enlace azo por la flora microbiana es mediada por acarreadores electrónicos de bajo peso molecular con un potencial redox entre -200 y -350 mV (Brown, 1981).

TABLA 2.9. Bacterias que reducen el grupo azo enzimáticamente en condiciones anaerobias

BACTERIAS	
<u>ANAEROBIAS</u>	<u>ANAEROBIAS FACULTATIVAS</u>
<i>Bacteroides</i> spp. (2) <i>Bifidobacterium</i> spp. (2) <i>Clostridium</i> spp. * (7) <i>Eubacterium</i> spp. * (3) <i>Fusobacterium</i> spp. (1) <i>Lactobacillus</i> spp. (1) <i>Peptococcus prevotii</i> <i>Peptostreptococcus productus</i> <i>Veillonella parvula</i>	<i>Butyrivibrio</i> sp. <i>Citrobacter</i> sp. <i>Coprococcus catus</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterococcus</i> spp. (2) <i>Escherichia y coli</i> * <i>Klebsiella aerogenes</i> <i>Pneumococcus</i> sp. <i>Proteus</i> spp. (1) <i>Ruminococcus bromii</i> <i>Salmonella</i> spp. (2) <i>Shigella dysenteriae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus</i> spp. (2)

FUENTE: Chung y col., 1979 y 1992; Dubin y Wright, 1975; Ghosh y col., 1989; Gingell y Walker, 1971; Horitsu y col., 1977; Kulla y col., 1983; Rafii y Cerniglia, 1995; Rafii y col., 1990; Ryan y col., 1968; Scheline y col., 1970; Spain, 1995; Walker, 1970; Walker y col., 1971; Walker y Ryan, 1971
 * Indica que también se ha reportado su capacidad para reducir nitroaromáticos
 () Indica el número de especies reportadas para ese género

En conclusión, el sistema azoreductasa anaerobio requiere de condiciones anaerobias y la presencia de cofactores donadores de electrones como NADPH, NADH y FADH₂. Es importante mencionar que la estructura del colorante azo, su potencial redox y la permeabilidad por parte de la célula hacia éste son una limitante para su biodegradación parcial, siendo particulares para cada sistema azocompuesto-microorganismo-ambiente.

Recientes investigaciones han revelado que bacterias del intestino humano, pertenecientes a los géneros *Clostridium* y *Eubacterium*, pueden reducir el enlace azo del colorante azul directo 15 y el grupo nitro de compuestos nitroaromáticos (hasta generar anilinas) con la misma reductasa, la cual parece ser una deshidrogenasa constitutiva involucrada en la transferencia de electrones y que utiliza FAD (Rafii y Cerniglia, 1993; 1995). Este hecho sugiere que los microorganismos que reducen compuestos nitroaromáticos podrían también reducir y colorantes azo. Entre los microorganismos capaces de reducir compuestos nitroaromáticos se encuentran diversas bacterias anaerobias (ver Tabla 2.9), las cuales realizan la reducción del grupo nitro vía intermediarios nitroso e hidroxilamino

hasta generar aminas (Spain, 1995). Cabe mencionar que se ha reportado la reducción del 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) hasta 2,4,6-triaminotolueno por *Desulfovibrio* ssp. (bacteria sulfato-reductora) y su capacidad para usarlo como fuente de nitrógeno (Boopathy y Kulpa, 1992); asimismo, diversas cepas de *Clostridium* pueden catalizar una reacción similar y parece ser que son capaces de degradar la molécula hasta pequeñas unidades de ácidos alifáticos.

- Degradación parcial de colorantes azo mediante microorganismos en aerobiosis

La capacidad para reducir parcialmente (decoloración) colorantes azo en condiciones aerobias ha sido reportada para el género *Pseudomonas* principalmente (ver Tabla 2.10). Hu (1994) observó la reducción de los colorantes azo RBB, RP₂B y V₂RP por *Pseudomonas luteola*, que fue aislada a partir de lodos de una planta tratadora de aguas residuales textiles; cabe mencionar que la reducción del colorante azo rojo G, en donde no se detectó actividad de azoreductasa, podría representar una fortuita reducción realizada por flavinas reducidas. Idaka y col. (1987), han descrito la reducción del enlace azo por *Pseudomonas cepacia* mediante una azoreductasa, que requirió de NADH o NADPH, siendo éste último el cofactor más efectivo. En *Pseudomonas pseudomallei* 13NA, se encontró una correlación entre el tiempo medio de decoloración y el peso molecular de los colorantes azo probados (Yatome y col., 1981).

TABLA 2.10. Microorganismos que reducen el grupo azo enzimáticamente en condiciones aerobias

MICROORGANISMO	
<u>BACTERIAS AEROBIAS</u> <i>Arthrobacter</i> sp. <i>Bacillus subtilis</i> <i>Frankia</i> sp. <i>Flavobacterium</i> sp. <i>Microbispora aerata</i> <i>Pseudomonas</i> spp. * (6) <i>Streptomyces</i> spp. * (3)	<u>HONGOS</u> <i>Phanerochaete chrysosporium</i> Levaduras

FUENTE: Cao y col., 1993; Chao y Lee, 1994; Hu, 1994; Idaka y col., 1987; Paszczynsky y col., 1992; Spain, 1995; Yatome y col., 1987; Yatome y col., 1990; Yatome y col., 1981

* Indica que también se ha reportado su capacidad para reducir nitroaromáticos

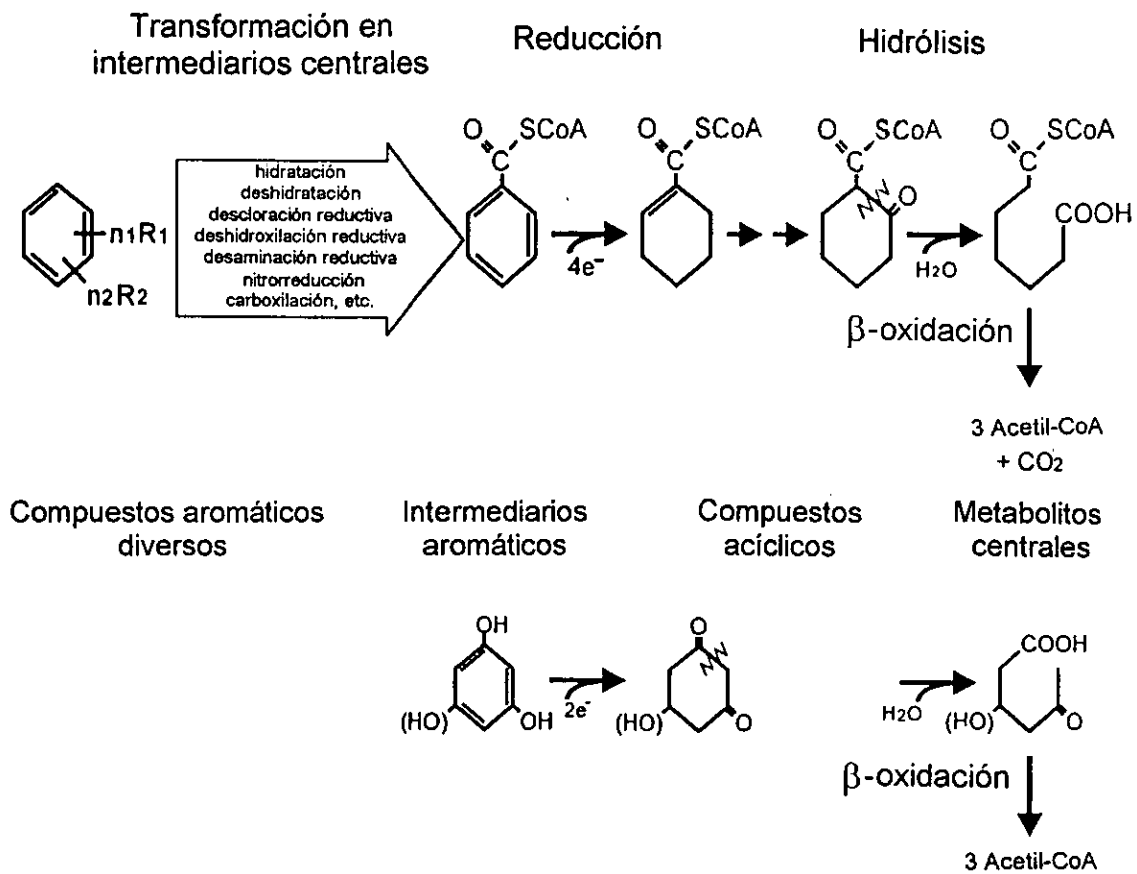
() Indica el número de especies reportadas para ese género

Adicionalmente, se ha reportado la reducción de colorantes azo en extractos celulares de *Aeromonas hydrophila* var. 24B, en donde se concluyó que el potencial redox del colorante no tiene una relación directa con la reducción del mismo (Yatome y col., 1987); asimismo, en extractos celulares de *Pseudomonas stutzeri*, se observó que tres colorantes azo con el mismo potencial redox eran reducidos con diferente grado (Yatome y col., 1990). Por otra parte, ha sido reportado la decoloración de colorantes azo mediante una peroxidasa extracelular aislada y purificada a partir de cepas de *Flavobacterium* sp. ATCC 39723. Esta enzima puede degradar parcialmente el colorante azo 3,5-dimetil-4-hidroxi-azobenceno-4'-sulfonato (Cao y col., 1993). Adicionalmente, se comprobó la decoloración del mismo colorante azo por peroxidasas en *Streptomyces* sp. YCED105, *Streptomyces* sp. YCED93, *S. griseofuscus*, *S. ambofaciens*, *Microbispora aerata*, *Arthrobacter* sp. (13727) y *Bacillus subtilis*.

Hidrólisis y fermentación (oxidación de la glucosa)

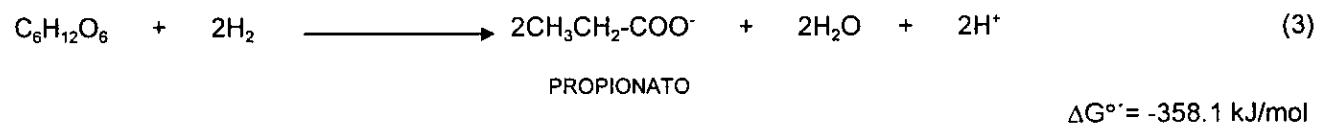
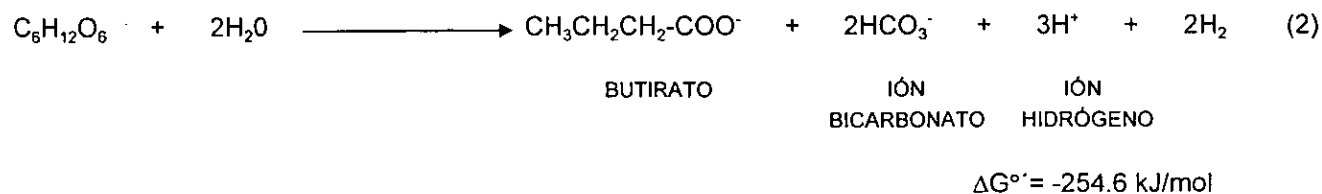
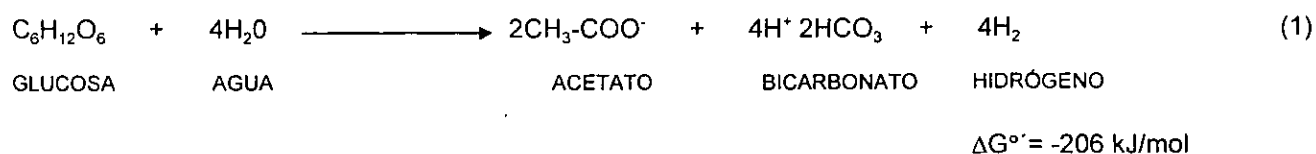
En esta etapa, la glucosa aportaría los equivalentes reductores para la degradación parcial del colorante azo, que se llevaría a cabo por otro grupo bacteriano; posteriormente, la mineralización de las aminas aromáticas correspondientes se realizaría por la vía que se presenta en la Figura 2.12. La glucosa sería metabolizada por las bacterias fermentadoras o glucolíticas para producir acetato, CO₂, hidrógeno y biomasa, mientras que los esqueletos carbonados de las aminas aromáticas se transformarían en ácidos grasos volátiles e hidrógeno por los oxidadores anaerobios a través de la β-oxidación.

FIGURA 2.12. Esquema de la vía de degradación anaerobia para compuestos aromáticos: R1 y R2 = -CH₃, -Cl, -NH₂, -NO₂, -OH, -COOH, etc; n1 y n2 = 0-6



FUENTE: Razo-Flores, 1997

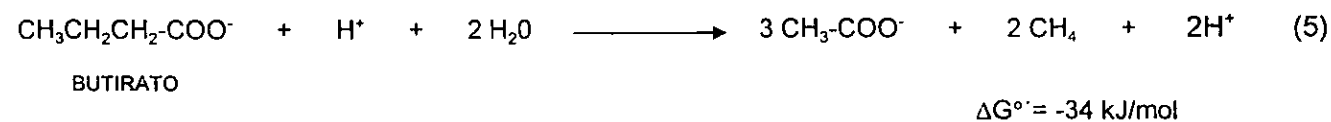
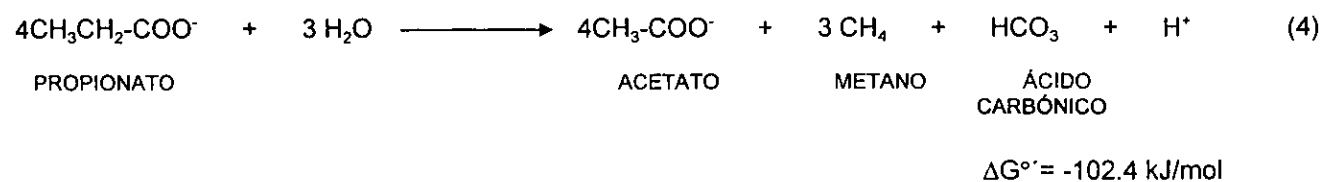
Las bacterias involucradas pueden ser anaerobias facultativas o estrictas, de crecimiento rápido con un tiempo mínimo de duplicación de 30 minutos; las bacterias fermentadoras o glucolíticas transforman la glucosa en función de la concentración de hidrógeno en el medio y de acuerdo con las siguientes reacciones:



Las bacterias anaerobias estrictas del género *Clostridium* constituyen una fracción importante de la población anaerobia responsable de la primera etapa, aunque se ha reportado la presencia de otros grupos bacterianos como la familia *Enterobacteriaceae* y los géneros *Bacteroides*, *Bacillus*, *Pelobacter*, *Acetobacterium* e *Ulyobacter*.

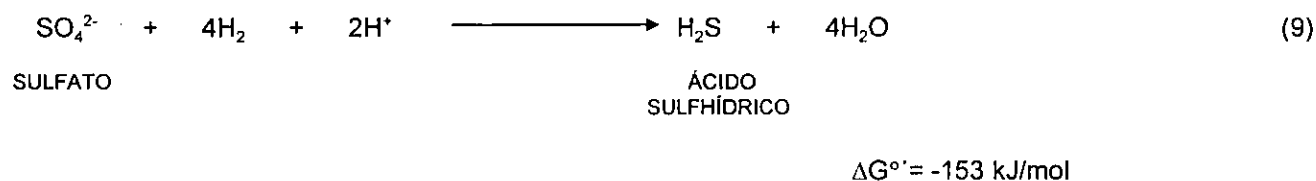
Acetogénesis

Durante este proceso, el propionato y el butirato generados en la etapa anterior son convertidos en acetato, hidrógeno y dióxido de carbono por un grupo de bacterias denominadas bacterias acetógenas productoras obligadas de hidrógeno (Obligated Hydrogen Producing Acetogen, OHPA). Estas bacterias son inhibidas por el hidrógeno que producen y, por tal razón, viven en una relación sintrófica con las bacterias metanógenas hidrogenófilas, quienes se encargan de consumir hidrógeno; cabe mencionar que la degradación de propionato a acetato se detiene cuando existen concentraciones de H_2 en el biogás de 500-50,000 ppm. Las OHPA en asociación con las metanógenas convierten los ácidos propiónico y butírico en ácido acético de acuerdo con las siguientes reacciones:



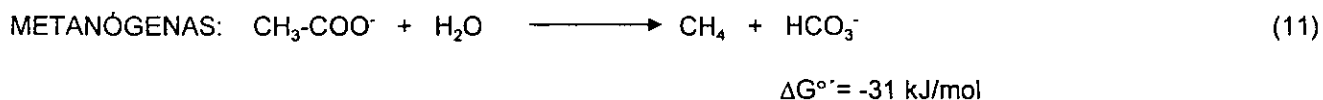
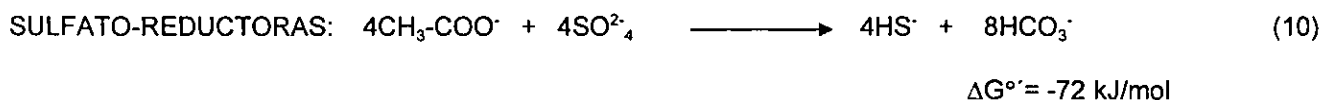
Esta reacción tiene una doble función, produce metano y elimina el hidrógeno gaseoso. Esta eliminación o consumo de hidrógeno regula la producción de ácidos generados por las bacterias "OHPA" y controla las rapideces a las que los ácidos propiónico y butírico son convertidos en ácido acético. Por consiguiente, se puede considerar que las metanobacterias hidrogenófilas regulan la degradación anaerobia; sus especies más representativas son *Methanobrevibacter arboriphilicus*, *Methanospirillum hungate* y *Methanobacterium formicicum*.

Otras bacterias presentes en los lodos granulares, especialmente cuando hay presencia de sulfatos, son las llamadas sulfato-reductoras, las cuales utilizan los sulfatos como aceptor final de electrones y lo reducen a sulfuros de acuerdo a la reacción:



Aunque la reacción sulfatorreductora es termodinámicamente más favorecida, ésta solo se realiza de manera significativa cuando los sulfatos se encuentran en concentraciones elevadas. Si esto sucede, se da una competencia con las metanogénicas impidiendo la formación de metano, ya que algunas sulfato-reductoras pueden utilizar acetato (ver Figura 2.13), aunque en general usan ácidos propiónico y láctico (Noyola y col., 1993). Existen dos grupos de sulfato-reductoras; el grupo I crece en presencia de lactato y sulfato, pero no pueden utilizar acetato, propionato o butirato como único donador de electrones y fuente de carbono, dentro de este grupo están los géneros *Desulfomonas* y *Desulfovibrio*; el grupo II, puede usar algunos de los ácidos grasos volátiles, benzoato o aún crecer quimioautotróficamente con H₂ o ácido fórmico como donadores de electrones y CO₂ como única fuente de carbono, los géneros más representativos son *Desulfobacter*, *Desulfococcus* y *Desulfosarcina*.

FIGURA 2.13. Competencia por el sustrato acetato entre bacterias sulfato-reductoras y metanógenas

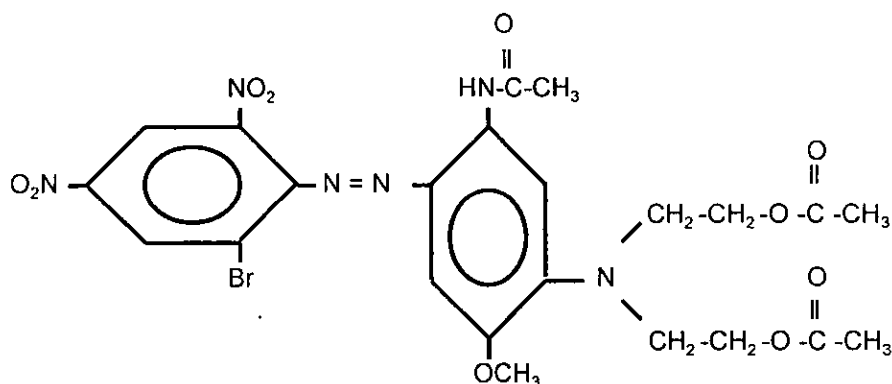


La capacidad de la bacteria sulfato-reductora *Desulfovibrio* sp. (Cepa B) para reducir compuestos nitroaromáticos como el trinitrotolueno y asimilarlo como fuente de nitrógeno (ver Figura 2.14) (Boopathy y col., 1993; Boopathy y Kulpa, 1992), convierte a este género bacteriano en candidato para realizar la mineralización de los colorantes azo en presencia o ausencia de sulfato en el medio,

3.1. INTRODUCCIÓN

El colorante azo marino terasil, con nombre comercial TERASIL NAVY GRL-01 200% (ver Figura 3.1), es un producto desarrollado por la División de Colorantes y Productos Químicos de la Empresa Ciba-Geigy Mexicana SA. de CV, el cual es utilizado en aplicaciones industriales de preparación, tintura o acabado de textiles. Este colorante tiene la característica de fijarse muy bien durante los procesos de teñido, por lo que el lavado resulta con muy poca pérdida del colorante (menor al 10%), lo cual implica beneficios económicos relacionados con la eficiencia del proceso y ambientales debido a la baja concentración del colorante en las aguas residuales. Dicha característica aunada al amplio mercado que existe para los textiles azules han convertido al colorante marino terasil en un producto comercialmente competitivo.

FIGURA 3.1. Estructura química del colorante azo marino terasil: N-(5-(Bis[2-acetiloxietil] amino)-2-((2-bromo-4,6-dinitrofenil) azo)-4-metoxifenil) acetamida



Como se mencionaba en el capítulo anterior, el lodo granular anaerobio se encuentra formado por gránulos y una pequeña porción de flóculos. Los primeros se definen como aglomerados de estructura densa, que aún después de sedimentar presentan una apariencia bien definida. Por otra parte, el flóculo es una estructura menos compacta, que después de sedimentar forma una capa microscópicamente homogénea (Famá, 1998).

Los gránulos están constituidos por polímeros extracelulares, que sirven de cemento y una asociación de diferentes microorganismos, que se encuentran relacionados de manera interdependiente: La ultraestructura formada en los gránulos parece ser muy particular, aunque algunos autores argumentan, que los gránulos alimentados con sustratos ricos en carbohidratos como la sacarosa presentan 3 capas, teniendo en la externa a las bacterias fermentativas, en la intermedia a las acetogénicas e hidrogenófilas y en el centro a las metanogénicas acetoclásticas; pero si el gránulo es alimentado con sustratos cuya etapa inicial de degradación es lenta, como en la acetogénesis del propionato, hidrólisis de las proteínas y acidogénesis del glutamato, presentan una distribución de microorganismos uniforme en todo el gránulo (Guiot y col., 1992; Fang y col., 1995).

El objetivo de este capítulo fue determinar las principales características físicas y biológicas del lodo granular anaerobio empleado en este estudio. Así como conocer la forma en que interactuaba el colorante azo marino terasil con los diferentes factores físicos y químicos involucrados en las pruebas de biodegradación de dicho colorante. El diseño experimental se muestra en el anexo I.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Colorante en estudio

El colorante azo marino terasil disperso en forma de sal sódica con fórmula: N-(5-(Bis[2-acetiloxietil] amino)-2-((2-bromo-4,6-dinitrofenil) azo)-4-metoxifenil) acetamida, utilizado en este estudio fue donado por la Empresa Ciba-Geigy Mexicana SA. de CV.

Material biológico

El material biológico usado fue un lodo granular anaerobio proveniente de un reactor anaerobio tipo UASB, que trataba las aguas residuales generadas durante el lavado de la cebada (almidones, celulosa y proteína soluble) en una maltería de la Cervecería Cuauhtémoc-Moctezuma S. A., localizada en Grajales, Edo. de Puebla. Al momento de la recolección, el lodo granular anaerobio tenía una eficiencia de remoción del 90% en términos de DQO y el sistema mantenía un α mayor de 0.65.

Medios de cultivo

Para las diferentes pruebas de estabilidad del colorante azo marino terasil se utilizó el medio de cultivo reportado por Donlon y col. (1996), pero modificado de la siguiente manera:

MEDIO DE CULTIVO	
COMPUESTO:	CANTIDAD (mg/L)
Glucosa ^a	926
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	2000
Fosfato monobásico de sodio (NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O)	795
Fosfato dibásico de potasio (K ₂ HPO ₄)	600
Cloruro de amonio (NH ₄ Cl)	280
Cloruro de magnesio (MgCl ₂ · 6 H ₂ O)	102
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	4.68
Sulfato de sodio (NaSO ₄) ^a	155
Colorante azo marino terasil ^a	Variable
Cisteína ^a	500
Solución de resazurina al 0.1 % ^a	1 mL
Solución de elementos traza o vestigiales	1 mL/L de medio
Agua destilada - cuanto baste para	1000 mL
 SOLUCION DE ELEMENTOS TRAZA:	 mg/L de solución.
Cloruro ferroso (FeCl ₂ · 4 H ₂ O)	2000
Cloruro manganoso (MnCl ₂ · 4 H ₂ O)	785.94
EDTA – sal sódica.	500
Acido bórico (H ₃ BO ₃)	50

Cloruro de zinc (ZnCl ₂)	50
Molibdato de amonio ((NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O)	50
Selenito de sodio (NaSeO ₃)	100
Cloruro de aluminio (Al ₂ Cl ₃ · 6 H ₂ O)	90.47
Cloruro de níquel (NiCl ₂ · 6 H ₂ O)	50
Cloruro de cobalto (CoCl ₂ · 6 H ₂ O)	71
Cloruro cúprico (CuCl ₂ · 2 H ₂ O)	50
Acido clorhídrico (HCl al 36 %)	1 mL

NOTA: ^a = Componentes nuevos o modificados en cantidad.

Después de la preparación del medio de cultivo, se procedió a reducirlo tal como lo indica el protocolo reportado por Hungate (1969), pero modificado según como se indica en el anexo II. Posteriormente, 70 mL de medio de cultivo fueron agregados en botellas serológicas (120 mL), las cuales se sellaron con tapones de goma y anillos de aluminio. Enseguida, se realizó el cambio de la atmósfera a cada botella con N₂:CO₂/95%:5% y se esterilizó durante 15 min a una presión de 103 kPa (15 lb/pulg²).

Al término de la esterilización, se verificó que el pH del medio de cultivo estuviera en un intervalo de 6.8 a 7.8, ya que en él se dan las mejores condiciones para la biodegradación anaerobia. Finalmente, para verificar la adecuada reducción del medio de cultivo, se procedió a incubar las botellas durante una noche en un cuarto con temperatura de 34±2°C. Sólo las botellas que mantuvieron la coloración amarilla del indicador redox fueron usadas para las diferentes pruebas, las demás fueron eliminadas.

Sólidos suspendidos (SSV y SST)

Los sólidos suspendidos volátiles (SSV) y totales (SST) se determinaron a partir de 5 mL de muestra, que fueron colocados en una cápsula de porcelana, que fue puesta previamente a peso constante (peso 1 en g). Dicha cápsula con la muestra se colocó en una estufa a 105°C durante 24 h. Posteriormente, se retiró de la estufa y fue colocada en un desecador durante una hora, para después ser pesada (peso 2 en g); finalmente, se colocó en una mufla a 550°C durante una hora y, por último, se dejó enfriar en la estufa a 105°C durante una hora y en un desecador hasta que fue posible pesarla nuevamente (peso 3 en g). La cantidad de SSV y SST se calculó de la siguiente manera:

$$\text{SSV (g/L)} = \text{Peso 2} - \text{Peso 3} / \text{volumen de la muestra}$$

$$\text{SST (g/L)} = \text{Peso 1} - \text{Peso 2} / \text{volumen de la muestra}$$

Granulometría

Una de las características más importantes para un lodo anaerobio, que será utilizado en un reactor de lecho de lodo de flujo ascendente es si se trata de un lodo granular, lo cual se asocia con un alta velocidad de sedimentación, buena compactación y una elevada actividad metanogénica. Aunque no existe una regla exacta que determine si un lodo es granular, se considera como tal si su fracción de granos es mayor del 50%. Para determinar el porcentaje de gránulos y flóculos en el lodo estudiado, se realizó la técnica del tamizaje, que consistió en tamizar 250 mL de lodo usando dos tamices, uno de malla 30 (0.6 cm) y otro de malla 40 (0.4 cm), de tal manera que en los tamices quedaban granos de determinado tamaño y en el lodo de la bandeja se recuperaban los flóculos, todos éstos fueron recolectados y aforados a un volumen apropiado, para finalmente realizarles la determinación de los sólidos suspendidos mediante los siguientes cálculos:

El porcentaje de los SST de cada fracción = $SST (g) \times 100 / \Sigma SST (g)$
El porcentaje de los SSV de cada fracción = $SSV (g) \times 100 / \Sigma SSV (g)$

Determinación del índice volumétrico y velocidad de sedimentación

Para calcular estos parámetros se agregaron 50 mL del lodo en una probeta de 250 mL y se completó el volumen con agua, se colocó cinta elástica (parafilm) en la boca de la probeta y se balanceó en posición horizontal hasta tener una solución homogénea. Finalmente, se colocó rápidamente en posición vertical, momento en el que inició la medición del tiempo de la sedimentación del lodo, que fue cada 15 s durante los primeros 2 min, posteriormente cada minuto hasta el minuto 15 y finalmente cada 5 min hasta que se cumplieran los 30 min de duración de la prueba. El volumen ocupado por el lodo después de este tiempo dividido por su contenido de SST fue tomado como el índice volumétrico de lodo (IVL). La velocidad máxima de sedimentación (m/h) corresponde a la pendiente (m^3/h) de los cinco primeros puntos de la curva de sedimentación graficada durante la determinación de índice volumétrico del lodo dividida por la sección de la probeta (m^2).

Determinación de la actividad metanógena específica

Las pruebas de actividad metanogénica fueron realizadas con la metodología descrita por Razo-Flores (1997); las muestras se tomaron cada hora y el gas metano producido fue cuantificado tal como se indica en los métodos analíticos. Se midió la actividad sólo para el ácido acético.

Determinación de la actividad sulfatorreductora específica

La actividad sulfatorreductora específica se llevó a cabo tal como lo reporta Visser (1995); pero modificada en la cantidad del inhibidor de la metanogénesis adicionada (2-Bromoetanosulfonato, BES), ya que se agregaron 50 mM de BES (Razo-Flores, 1997). Las muestras se tomaron cada 1.5 h y el sulfato residual fue cuantificado tal como se indica en los métodos analíticos.

Determinación del número más probable de células

La técnica se realizó de acuerdo a los medios propuestos por Balch y col. (1979) y la metodología indicada en el Anexo III. El valor del pH del medio estuvo en un intervalo de 6.8 a 7.8, que es adecuado para la biodegradación anaerobia. El medio fue esterilizado durante 15 min a 103 kPa (15 lb_f/pulg²) y, posteriormente, incubado durante una noche para verificar la reducción del medio y sólo se usaron los tubos que conservaron el color amarillo indicativo de las condiciones redox adecuadas. Para la inoculación con el lodo, éste fue previamente lavado y macerado. A partir de un mililitro de lodo macerado se hicieron diluciones con las cuales se inocularon los tubos; los medios utilizados para esta técnica se muestran en los apartados III.I, III.II y III.III del Anexo III.

Métodos analíticos

I. Cuantificación de gases

La producción de metano fue cuantificado mediante la inyección de 0.5 mL del biogás, generado dentro de la botella serológica, en un cromatógrafo de gases con detector de conductividad térmica

(Fisher gas partitioner modelo 1200) de doble columna (Poropak Q y malla molecular 5A) que emplea helio como gas acarreador a un flujo de 25 mL/min.

II. Cuantificación de la demanda química de oxígeno (DQO)

La cantidad de materia orgánica e inorgánica susceptible a ser oxidada, llamada demanda química de oxígeno (DQO), se evaluó mediante el método del reflujo cerrado con dicromato tal como lo indica APHA-AWWA-WPFC (1996).

III. Determinación del valor de pH

La determinación del valor de pH se realizó con un potenciómetro Beckman con ajuste de temperatura.

IV. Cuantificación del sulfato

Para la cuantificación del sulfato residual, cada muestra fue filtrada con filtros de nitrocelulosa, que tenían un diámetro de 0.22 μm ; posteriormente, cada vial con el filtrado se analizó en un cromatógrafo de aniones (cromatógrafo de líquidos de alta resolución, CLAR, o HPLC por sus siglas en inglés), que también podía analizar fosfato, nitrito, nitrato y cloruro. El patrón usado consistía en una solución con cantidades conocidas de 0 a 100 ppm de todos los aniones mencionados.

V. Cuantificación de proteína

La cantidad de proteína presente en el lodo granular anaerobio se cuantificó mediante el método colorimétrico de Lowry *et al.*, (1951); el cual se basa en la formación de un complejo colorido entre el grupo fenólico de la tirosina o grupo aromático en el caso del triptófano, histidina y fenilalanina de las proteínas y el ácido fosfotungstomolibdico que oxida al grupo hidroxilo de la tirosina en condiciones alcalinas, dando un color azul intenso que puede medirse a una longitud de onda de 595 nm. La técnica consiste en tomar 1 mL homogéneo de lodo y añadirle 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10%, dejarlo en congelación por lo menos 12 horas; después, descongelar la muestra y centrifugar a 4000 rpm durante 10 min, retirar el TCA y adicionar 1 mL de hidróxido de sodio 0.4 M, agitar y tomar una alícuota de 200 μL para diluirlos hasta 1 mL; finalmente, leer la absorbancia a 595 nm. El patrón de comparación es una curva hecha con albúmina sérica bovina.

VI. Determinación del porcentaje de decoloración

El porcentaje de decoloración fue determinado mediante espectrofotometría (Kuo, 1992), el método consistió en centrifugar la muestra a 3000 rpm durante 5 min para separar el sobrenadante, al que se le realizó un barrido desde los 400 a los 700 nm con intervalos de 10 en un espectrofotometro Beckman. Las absorbancias obtenidas fueron sumadas y comparadas con la sumatoria obtenida de un control inicial al 100% para calcular el porcentaje de decoloración de la muestra:

$$\text{Porcentaje de decoloración} = \frac{\sum \text{Absorbancia inicial de la muestra} - \sum \text{Absorbancia final de la muestra}}{\sum \text{Absorbancia inicial de la muestra}} \times 100$$

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Caracterización del colorante azo "marino terasil"

La caracterización del colorante marino terasil incluyó la determinación la demanda química de oxígeno, su espectro de adsorción y estabilidad ante algunos factores físicos y químicos.

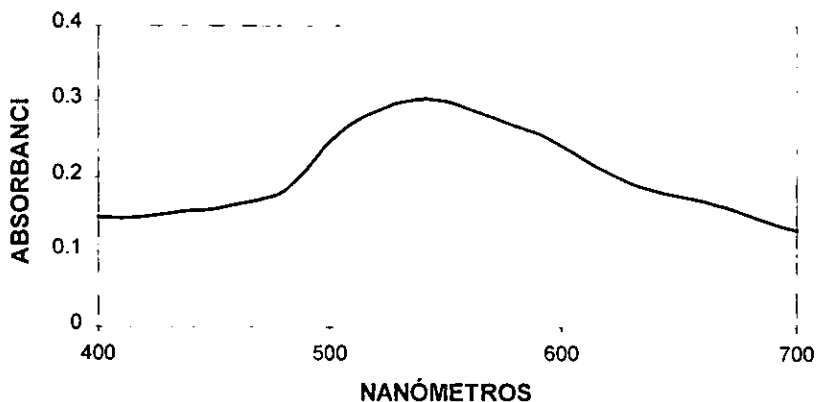
Demanda química de oxígeno (DQO)

La DQO del colorante marino terasil fue cuantificada, como ya se mencionó, mediante el método del reflujo cerrado con dicromato. Resultó en una DQO de 26.6 mg O₂/L para una concentración de 20 mg/L de marino terasil. Este valor de DQO para los 20 mg/L del colorante fue extrapolado a partir de valores mayores a 50 mg/L, ya que a concentraciones de 20 mg/L la técnica no estimaba valores.

El pequeño valor de la DQO del colorante hace poco factible considerar este parámetro como un indicativo de la biodegradación del colorante, ya que la técnica está limitada para estimar bajas concentraciones del colorante, por lo que no hay manera de saber si el colorante se encuentra presente a menos que sea el único compuesto medible por la técnica de la DQO.

Espectro de absorción del colorante

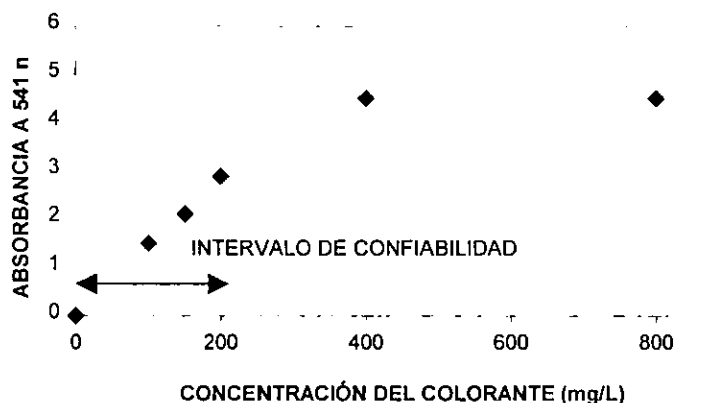
Se verificó el pico de absorción máxima reportado (557 nm) para el colorante azo marino terasil en un intervalo de 400 a 700 nm, obteniéndose que a los 541 nm se registraba la máxima absorbancia (ver Gráfica 3.1). Este pico máximo de absorbancia se observó en el medio de cultivo reportado por Donlon y col. (1996), que sería utilizado para las pruebas intermitentes ("batch") y en el agua residual sintética, que se usaría para la aclimatación del lodo al colorante marino terasil. Esta ligera variación en el pico máximo de absorción pudo ser causada por los fenómenos de resonancia que puede presentar la estructura del colorante.



GRÁFICA 3.1. Espectro de absorción del colorante marino terasil (50 mg/L); el barrido de 400 a 700 nm se hizo con obtención de datos cada 10 nm

Por otra parte, para conocer la linealidad en la cuantificación espectrofotométrica del colorante marino terasil se realizó una curva patrón con concentraciones de 0 a 800 mg/L del colorante,

obteniéndose que existe una perfecta linealidad hasta los 200 mg/L del colorante y a concentraciones mayores empieza a cambiar la pendiente (ver Gráfica 3.2).



GRÁFICA 3.2. Curva patrón del colorante marino terasil a partir del pico de máxima absorbancia

Debido a que la confiabilidad en la cuantificación del marino terasil sólo alcanza hasta concentraciones de 200 mg/L, se decidió usar en los experimentos de biodegradación posteriores concentraciones de 0 a 200 mg/L de marino terasil.

Estabilidad

Las pruebas de estabilidad del colorante marino terasil se realizaron con el propósito de conocer cualquier efecto abiótico del medio de cultivo y factores fisicoquímicos involucrados en los posteriores experimentos. En la Tabla 3.1 se resumen los resultados obtenidos en cada tratamiento.

TABLA 3.1. Porcentaje de decoloración del marino terasil ante algunos factores físicos y químicos involucrados en las pruebas posteriores de aclimatación y biodegradación

TRATAMIENTOS CONTENIENDO AL COLORANTE AZO MARINO TERASIL" A UNA CONCENTRACIÓN DE 50 mg/L	PORCENTAJE DE DECOLORACIÓN	OBSERVACIONES
Esterilización del medio en autoclave	50	Se realizó durante 20 min a 103 kPa
Incremento de la acidez en el medio	38	Se usó HCl hasta un pH de 0.4
Incremento de la alcalinidad en el medio	11.8	Se usó NaOH hasta un pH de 13.4
Medio a baja temperatura (4°C)	5.2	Después de 30 días
Medio a temperatura ambiente (24.5°C)	10.9	Después de 30 días
Medio a temperatura de 35°C con agitación a 140 rpm	24.5	Después de 30 días
Agua residual sintética (ARS) ^a	2.0	Medio para la aclimatación

a. Tratamiento con 20 mg/L de colorante azo

En la tabla anterior se observa que el agua residual sintética (ARS), para alimentar el reactor durante la aclimatación, decolora en un 2%. Esta pérdida se considera poco significativa, por lo que no fue considerada para el análisis de la decoloración durante la aclimatación.

En relación con el medio de cultivo, el marino terasil resultó ser inestable ante las condiciones de esterilización empleadas para dicho medio (20 min a una presión de 103 kPa (15 lb/pulg²), obteniéndose un decremento del 50% de la absorbancia en comparación con la registrada antes de la esterilización; por lo que no es posible someter al colorante a la esterilización.

En condiciones de incremento de la acidez hasta un pH de 0.4 el colorante mostró un porcentaje de decoloración máximo de 38.3%; mientras que en condiciones de incremento de la alcalinidad hasta un pH de 13.4, se decoloró en un 11.8%. Es importante mencionar, que en los rangos de pH entre 6 y 8 no se detectó decoloración, por lo que se concluye que el pH no influye en la decoloración dentro de los rangos propicios para la digestión anaerobia.

Por otra parte, la temperatura parece tener diferentes efectos en la estabilidad del colorante en el medio de cultivo, ya que a las temperaturas de almacenaje de soluciones y medios de cultivo (4°C) perdió el 5.2% de color después de 7 días; a temperatura ambiente la decoloración aumentó al doble; y a la temperatura de incubación (37°C) con agitación a 140 rpm la decoloración casi alcanzó el 25%. Este valor tal alto de decoloración podría deberse al efecto en conjunto de agentes reductores como la cisteína contenida en el medio, la temperatura y la agitación; por lo que para las pruebas que se realicen con dichas condiciones se deben tener controles que estimen la decoloración o degradación parcial abiótica del marino terasil.

3.3.2. Caracterización del lodo granular anaerobio

Para la caracterización del lodo granular anaerobio se determinaron las actividades metanogénica y sulfatorreductora, la toxicidad del colorante, el número más probable de cada grupo bacteriano que conforma el lodo, la granulometría, la velocidad de sedimentación, los sólidos suspendidos y la proteína contenida en los gránulos y el flóculo. Los resultados obtenidos se detallan a continuación.

Granulometría del lodo

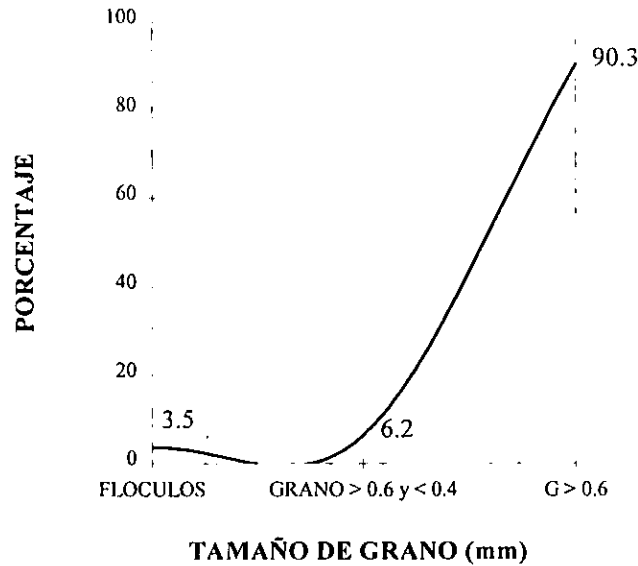
La presencia de gránulos o granos en el lodo anaerobio hizo necesaria la realización de la granulometría del mismo, obteniéndose los resultados presentados en la Tabla 3.2.

TABLA 3.2. Granulometría del lodo en estudio

TAMAÑO DEL GRANO	SSV (g/L)	SST (g/L)	SSF (g/L) ^a	PORCENTAJE
GRANO > 0.6 mm	54.67	70	15.33	90.3
GRANO < 0.6 y > 0.4 mm	23.45	36.35	12.9	6.2
FLÓCULOS	0.131	0.221	0.09	3.5

a. Los sólidos suspendidos fijos (SSF) resultan al restar los SST menos los SSV

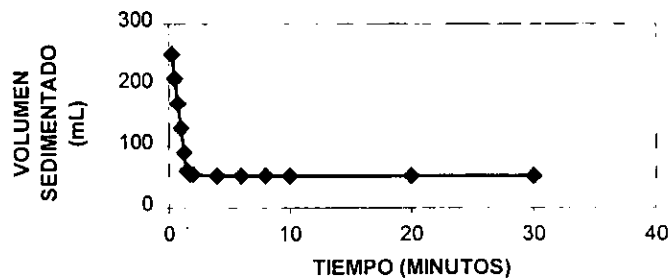
El alto porcentaje de granos (96.5%) hace suponer que la actividad metanogénica del lodo en estudio es alta según algunos autores que relacionan la granulación de un lodo con una distribución de los diferentes grupos bacterianos de tal manera que existe una eficiente actividad metanogénica en cada grano. Esto tendría un efecto benéfico en un reactor, ya que los diferentes tipos de gránulos ocuparían los espacios existentes entre ellos mismos, esta característica se muestra Gráficamente mediante una curva sigmoide obtenida al gráficar el tamaño del grano contra su porcentaje (ver Gráfica 3.2).



GRÁFICA 3.2. Curva sigmoide, que resultó por la granulometría realizada al lodo en estudio

Indice volumétrico de los lodos (IVL) y velocidad máxima (V_{máx}) de sedimentación

El IVL, que se llevó a cabo para conocer la sedimentabilidad del lodo, fue de 11.63 mL/g SST, lo cual indica un buen grado de compactación (ver Gráfica 3.3), que coincide con la granulometría del lodo. Dicha compactación se tradujo en una buena sedimentabilidad con una V_{máx} de 12 m/h.



GRÁFICA 3.3. Cinética de la sedimentabilidad del lodo granular anaerobio

Determinación del número más probable en el lodo

Como ya se mencionó en el inciso anterior, para estimar el número de células para cada grupo bacteriano presente en el lodo, se realizó la técnica del "Número Más Probable", obteniéndose los resultados que se indican en la Tabla 3.3. Los detalles de la técnica se mencionan en el Anexo III.

TABLA 3.3. Estimación del número más probable de células de cada grupo bacteriano contenido en el lodo

GRUPO BACTERIANO	NÚMERO MÁS PROBABLE / g SSV	PORCENTAJE
Glucolíticas (Fermentativas)	20,760.49 x 10 ⁴	94.92
Sulfato reductoras	983.39 x 10 ⁴	4.50
Acetoclásticas	1.53 x 10 ⁴	0.01
Hidrogenófilas	37.20 x 10 ⁴	0.17
OHPA-B	76.80 x 10 ⁴	0.35
OHPA-P	9.87 x 10 ⁴	0.05

Los resultados indicaron que hay una gran cantidad de bacterias glucolíticas y sulfatorreductoras en comparación con cualquier otro de los grupos estimados mediante esta técnica. La abundante presencia de dichos grupos hace factible que puedan degradar al colorante azo en estudio, ya que está ampliamente reportada la participación de bacterias fermentativas en la reducción enzimática del enlace azo mediante azoreductasas inespecíficas como la enzima denominada flavina dinucleótido deshidrogenasa descrita por Raffi y Cerniglia (1995). Por otra parte, la existencia de bacterias sulfato-reductoras hace factible la desaminación reductiva de las aminas aromáticas, que se generarían al reducir el enlace azo, ya que ha sido reportada la desaminación reductiva del 2,4,6-triaminotolueno y anilina por *Desulfovibrio* sp (Boopathy y col., 1992 y 1993) y *Desulfobacterium anilini* (Schnell y Schinx, 1991) respectivamente. Respecto con la degradación del anillo aromático, Young (1984) ha reportado mucha evidencia sobre la participación de consorcios microbianos en la degradación anaerobia de compuestos aromáticos.

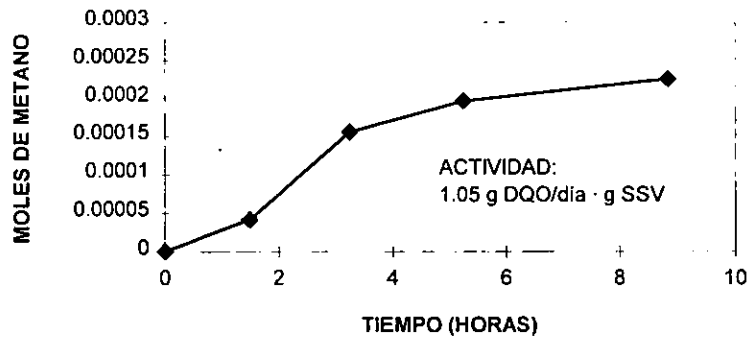
Actividades metanogénica y sulfato-reductora del lodo

Para medir la actividad metanogénica y sulfato-reductora se empleó el medio de cultivo reportado por Razo-Flores (1997) y Visser (1995), respectivamente, que a diferencia del medio de cultivo descrito por Balch y col. (1979), no contienen peptona y la cantidad de extracto de levadura es menor, siendo más apropiado para los objetivos de este estudio. En la Tabla 3.4 se muestran los resultados de las actividades mencionadas, así como las determinaciones de sólidos suspendidos y proteína contenida en gránulos y flóculo.

TABLA 3.4. Algunas características del lodo granular anaerobio

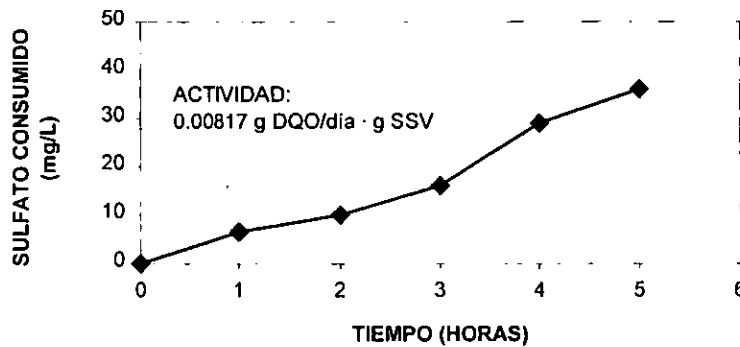
ACTIVIDAD METANOGENICA (g DQO/día · g SSV)	ACTIVIDAD SULFATO-REDUCTORA (g DQO/día · g SSV)	SSV (g/L)	SST (g/L)	SSF (g/L)	PROTEÍNA (mg/mL)	
					GRÁNULOS	FLÓCULO
1.05	0.00817	46.36	89.32	42.96	736	610

La actividad metanogénica del lodo tuvo un valor aceptable, lo cual coincide con el alto porcentaje de gránulos en el lodo, que suele estar relacionado con una eficiente actividad metanogénica; esto coincide con los datos sobre la eficiencia del lodo (más del 85%) estimada en DQO, que reportó la planta de tratamiento de aguas residuales donde fue recolectado el mismo. En la Gráfica 3.4 se muestra la cinética de la actividad metanogénica.



GRÁFICA 3.4. Cinética de la actividad metanogénica del lodo granular anaerobio

Respecto a la actividad sulfatorreductora (ver Gráfica 3.5), ésta fue de 0.00817 g DQO/día · g SSV, lo cual indica que la actividad metanogénica es también alta, aún en presencia de sulfato, ya que la actividad metanogénica es mucho mayor que la sulfatorreductora. Esto pudo deberse a que el lodo proviene de un reactor metanogénico y, por lo tanto, está aclimatado a tales condiciones.



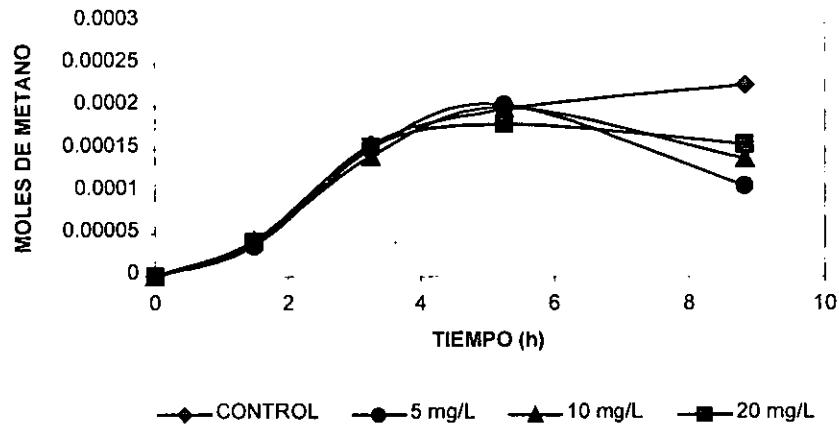
GRÁFICA 3.5. Cinética de la actividad sulfato-reductora del lodo granular anaerobio

Por otra parte, la prueba para determinar la actividad sulfatorreductora se llevó a cabo con un relación $DQO/SO_4^{2-} \approx 10$, que pudo producir un efecto tóxico debido a la presencia del H_2S en el medio, el cual crearía un fuerte estrés para las bacterias sulfatorreductoras conforme éstas redujeran el sulfato contenido en el medio.

Prueba de toxicidad

Con el antecedente que indica una inhibición de la digestión en términos de la producción de metano a una concentración de 100 mg/L del colorante marino terasil (Guerrero *et al.*, 1997), se procedió a

realizar una prueba de toxicidad bajo en mismo criterio. En la Gráfica 3.6, se muestra el efecto de tres concentraciones del colorante sobre la actividad metanogénica con relación al control, observándose que las tres concentraciones tienen una actividad similar al control durante las primeras 5 horas de la prueba pero, posteriormente, disminuyeron su actividad, mientras que el control continuo.



GRÁFICA 3.6. Efecto de diferentes concentraciones del colorante azo marino terasil sobre la actividad metanogénica del lodo granular anaerobio

Sobre la base de los resultados obtenidos, se concluyó que la actividad metanógena del lodo granular anaerobio, medida como producción de metano, fue afectada ligeramente por todas las concentraciones del colorante azo marino terasil utilizadas.

A partir de este resultado, se decidió usar una concentración de 20 mg/L del colorante para la aclimatación del lodo en un reactor LLGE sulfatorreductor; esta experiencia se describe en el siguiente capítulo.

CAPÍTULO 4. Aclimatación del lodo granular anaerobio al colorante azo marino terasil en un reactor tipo EGSB sulfato-reductor

4.1. INTRODUCCIÓN

La aclimatación es un proceso que se realiza con el propósito de exponer a un microorganismo o grupo de microorganismos ante un compuesto, generalmente xenobiótico, con el cual nunca habían entrado en contacto o sólo en forma muy esporádica. Finalmente, se obtiene una respuesta de aclimatación por parte de los microorganismos, que se puede interpretar como tolerancia hacia el compuesto o asimilación, desasimilación o transformación de la sustancia.

En los procesos biológicos anaerobios para el tratamiento de aguas residuales suelen realizarse aclimataciones para adaptar lodos o bacterias a una o varias sustancias que se desean eliminar de los efluentes; en el caso de las aguas residuales de origen textil, como ya se mencionó, éstas vienen con una alta concentración de colorantes, frecuentemente de tipo azo, que son difíciles de degradar y, por lo tanto, se opta por una aclimatación.

Las experiencias en el grupo de trabajo de Ilangovan (1996), relacionadas con la biodegradación de colorantes azo contenidos en efluentes textiles a nivel de laboratorio, se han realizado empleando un reactor anaerobio de lecho de lodo granular expandido (LLGE), también conocido como EGSB por sus siglas en inglés (Expanded Granular Sludge Blanket), en donde se ha descrito una decoloración de hasta el 80% y eficiencias del 60% en la remoción de la DQO total y soluble a una velocidad del flujo ascendente igual a 0.9 m/h con una relación DQO/SO_4^{2-} entre 5 y 6, concluyéndose que las bacterias sulfatorreductoras incrementaban la decoloración en el sistema (Ilangovan y Briones, 1995). Para establecer la relación másica DQO (g)/ SO_4^{2-} (g) indicada con anterioridad, Ilangovan y Briones (1995) probaron diferentes relaciones de DQO/SO_4^{2-} en el intervalo de 20 a 2, para determinar cual de ellas favorecería la decoloración y, por ende, la disminución de la materia orgánica (expresada como DQO). La Tabla 4.1 resume los resultados experimentales obtenidos a diferentes relaciones de DQO/SO_4^{2-} y la eficiencia en la remoción de DQO.

TABLA 4.1. Resumen de las relaciones DQO/SO_4^{2-} y eficiencias de remoción de la DQO

RELACIÓN (DQO/SO_4^{2-})	EFICIENCIA DE REMOCIÓN DE DQO (%)
3-7	69-76
7-11	58-62
11-15	44-63
15-20	42-61

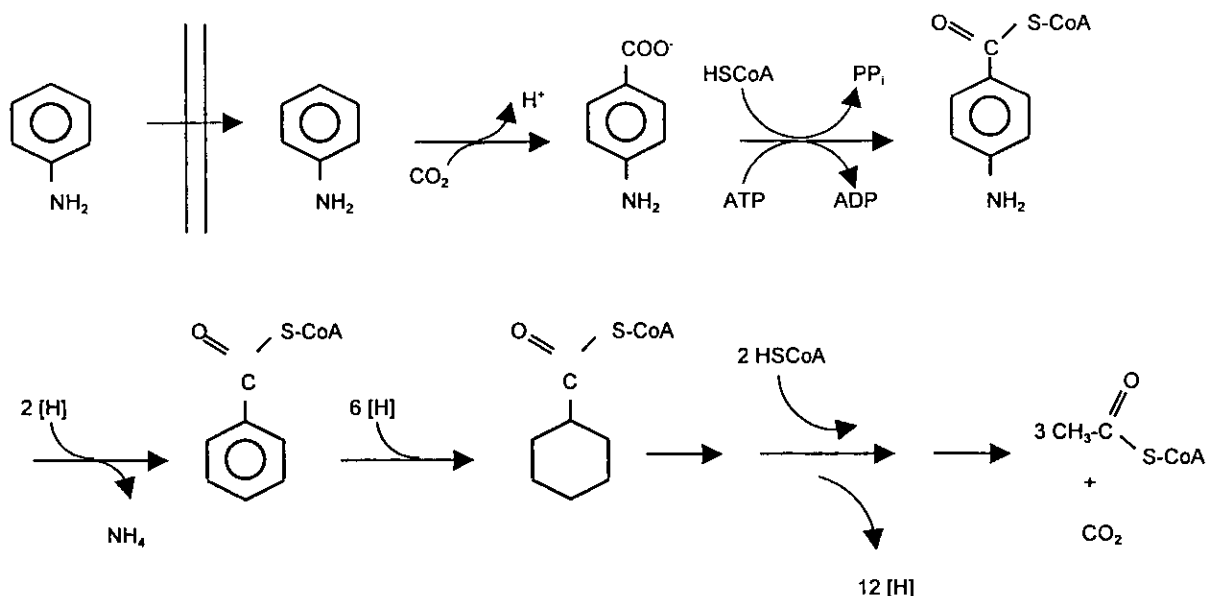
FUENTE: Ilangovan y Briones, 1995

En la Tabla anterior, se puede apreciar que la mejor relación másica DQO/SO_4^{2-} se da en el intervalo de valores de 3 a 7, y es en donde se obtienen las eficiencias de remoción más altas de DQO, que van desde 69 a 76%. Sin embargo, los estudios sobre el tratamiento anaerobio de aguas residuales conteniendo sulfato realizados por Visser (1995), concluyeron que existe un efecto tóxico para las bacterias debido al H_2S producido. Dicho efecto, de acuerdo con este investigador, se presenta con

relaciones DQO/SO₄⁼ menores de 10, por lo que un sistema con una relación DQO/SO₄ entre 3 y 7 sería muy tóxico para el consorcio bacteriano. El hecho de que dicho intervalo beneficiara la degradación de colorantes azo podría estar relacionado con el metabolismo anaerobio sulfato-reductor, que genera H₂S, un agente reductor que capaz de reducir compuestos nitroaromáticos como el orto-nitrofenol (Gorontzy y col., 1993), el cual podría reducir el grupo azo del colorante y generar las respectivas aminas aromáticas, las cuales serían desaminadas reductivamente por las bacterias sulfatoreductoras o por algún género bacteriano fermentativo.

La utilización de aminas aromáticas como fuente de nitrógeno por *Desulfovibrio* sp. (bacteria sulfato-reductora) ha sido descrito por Boopathy y col. (1993) y Boopathy y Kulpa (1992), quienes reportaron la reducción de 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) hasta 2,4,6-triaminotolueno (ver Figura 2.8), y posterior asimilación del grupo amino como fuente de nitrógeno. Asimismo, diversas cepas de *Clostridium* pueden catalizar una reacción similar y al parecer son capaces de degradar la molécula hasta pequeñas unidades de ácidos alifáticos. Adicionalmente, Schnell y Schink (1991) observaron que *Desulfobacterium anilini* puede utilizar anilina como fuente de nitrógeno (ver Figura 4.1), en este trabajo reportaron una acumulación de benzoato, concluyéndose que antes de la desaminación reductiva hay una carboxilación, que permite tener un compuesto más soluble que el benceno resultante de la desaminación.

FIGURA 4.1. Degradación anaerobia de anilina por *Desulfobacterium anilini* propuesta por Schnell y Schink



FUENTE: Schnell y Schink, 1991

Estos dos factores mencionados con anterioridad, el ácido sulfhídrico y la asimilación del grupo amino de las aminas aromáticas como fuente de nitrógeno, podrían haber sido los causantes de los resultados obtenidos por Ilangovan y Briones (1995).

Por otra parte, ha sido reportada la biodegradación del colorante azo marino terasil empleando un reactor anaerobio tipo UASB, en donde se obtuvo un 80% en la remoción de DQO cuando se utilizó

simultáneamente ácido acético como cosustrato y una disminución del color (decoloración) conforme se incrementaba la concentración de sulfato en el medio. Adicionalmente, se concluyó, basándose en producción de metano a diferentes concentraciones del colorante azo que, a concentraciones mayores a 100 mg/L del colorante, fue inhibido el proceso de la digestión (Guerrero y col., 1997). Es importante mencionar que la disminución de la DQO reportada en este trabajo representa sólo al ácido acético, ya que cuantificaciones de la DQO del colorante azo marino terasil realizadas en este estudio (ver capítulo 3) indicaron que dicha DQO es muy baja, por lo que no sería confiable relacionar el decremento de la DQO con la desaparición del colorante azo en el efluente cuando se adiciona un cosustrato como fuente de carbono.

Adicionalmente, un estudio sobre la biotransformación y biodegradación de compuestos aromáticos N-sustituídos usando un lodo granular en condiciones metanogénicas (Razo-Flores, 1997), reportó para la biodegradación de colorantes azo un efecto positivo de la glucosa como cosustrato y proponen que las bacterias rompen el enlace azo de los colorantes como una respuesta a la toxicidad de los mismos, dicho rompimiento genera aminas aromáticas carcinogénicas, que dependiendo de la estructura del azocompuesto, pueden ser totalmente asimiladas por otros grupos bacterianos o persistir en el ambiente.

En base a los elementos expuestos y al análisis desarrollado con anterioridad, se decidió realizar la aclimatación del lodo al colorante azo marino terasil (20 mg/L) en un reactor tipo EGSB, usando una relación $DQO/SO_4^{2-} = 10$, para evitar un posible efecto tóxico del H_2S sobre el consorcio bacteriano al pH en que se desarrolla la digestión o más bajos (Reis y col., 1991; Visser, 1995). Con respecto al cosustrato, se optó por la glucosa, ya que Razo-Flores (1997) reportó que dicho carbohidrato favoreció la biodegradación de azocompuestos en comparación con una mezcla de ácidos grasos volátiles; además, se aprovecharía el potencial catabólico del grupo bacteriano glucolítico. Cabe mencionar que sólo se usó como fuente de nitrógeno al marino terasil con el objetivo de generar una presión ambiental sobre el consorcio bacteriano para inducir la utilización de las aminas aromáticas como fuente de nitrógeno. Los detalles del proceso y pruebas complementarias se describen a continuación.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Los siguientes materiales y métodos que se describen son aquellos que no han sido descritos en el capítulo anterior o difieren en algún aspecto.

Determinación de la adsorción del colorante por el lodo

La cuantificación de la adsorción inicial del colorante por el lodo fue llevada a cabo de acuerdo a la técnica desarrollada por Hitz y col. (1978), pero con la variante de la agitación a 100 rpm. Para la prueba se utilizaron botellas serológicas conteniendo el ARS con 25 mg/L de marino terasil y 20 mL de lodo. Las botellas, que fueron selladas con septos de goma y anillos de aluminio, se incubaron a $34 \pm 2^\circ C$ durante 30 min en agitación. La recuperación del colorante adsorbido por el lodo se realizó mediante metanol absoluto.

Medios de cultivo

La composición del agua residual sintética (ARS), para alimentar el reactor tipo EGSB, fue la siguiente:

AGUA RESIDUAL SINTÉTICA (ARS)

COMPUESTO:	CANTIDAD (mg/L)
Glucosa	926
Sulfato de sodio (NaSO_4) ^a	155
Colorante azo marino terasil	20
Fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4)	250
Bicarbonato de sodio (NaHCO_3) ^b	1500
Solución de elementos traza	1 mL/L de ARS
Agua destilada - cuanto baste para pH final	1000 mL 7.4 - 7.8

SOLUCIÓN DE ELEMENTOS TRAZA:	mg/L de solución.
Cloruro ferroso ($\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$)	2000
Cloruro manganoso ($\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$)	785.94
EDTA - sal sódica.	500
Ácido bórico (H_3BO_3)	50
Cloruro de Zinc (ZnCl_2)	50
Molibdato de amonio ($(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7 \text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$)	50
Selenito de sodio (NaSeO_3)	100
Cloruro de aluminio ($\text{Al}_2\text{Cl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	90.47
Cloruro de níquel ($\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	50
Cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	71
Cloruro cúprico ($\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	50
Ácido clorhídrico (HCl al 36 %)	1 mL

a = La cantidad de Na_2SO_4 añadida equivale a 96 mg/L de SO_4^{2-} , para tener una relación $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-} \approx 10$ en el ARS. La DQO del ARS fue en promedio de 933 mg O_2/L ($933/96=9.7$).

b = Componente agregado debido a la acidificación del medio por la rápida metabolización de la glucosa y la lenta asimilación de los AGV generados.

Pruebas bacteriológicas

I. Tinción de Gram

La tinción de Gram se realizó como se indica en Jawetz y col. (1987).

II. Observación de los gránulos de azufre

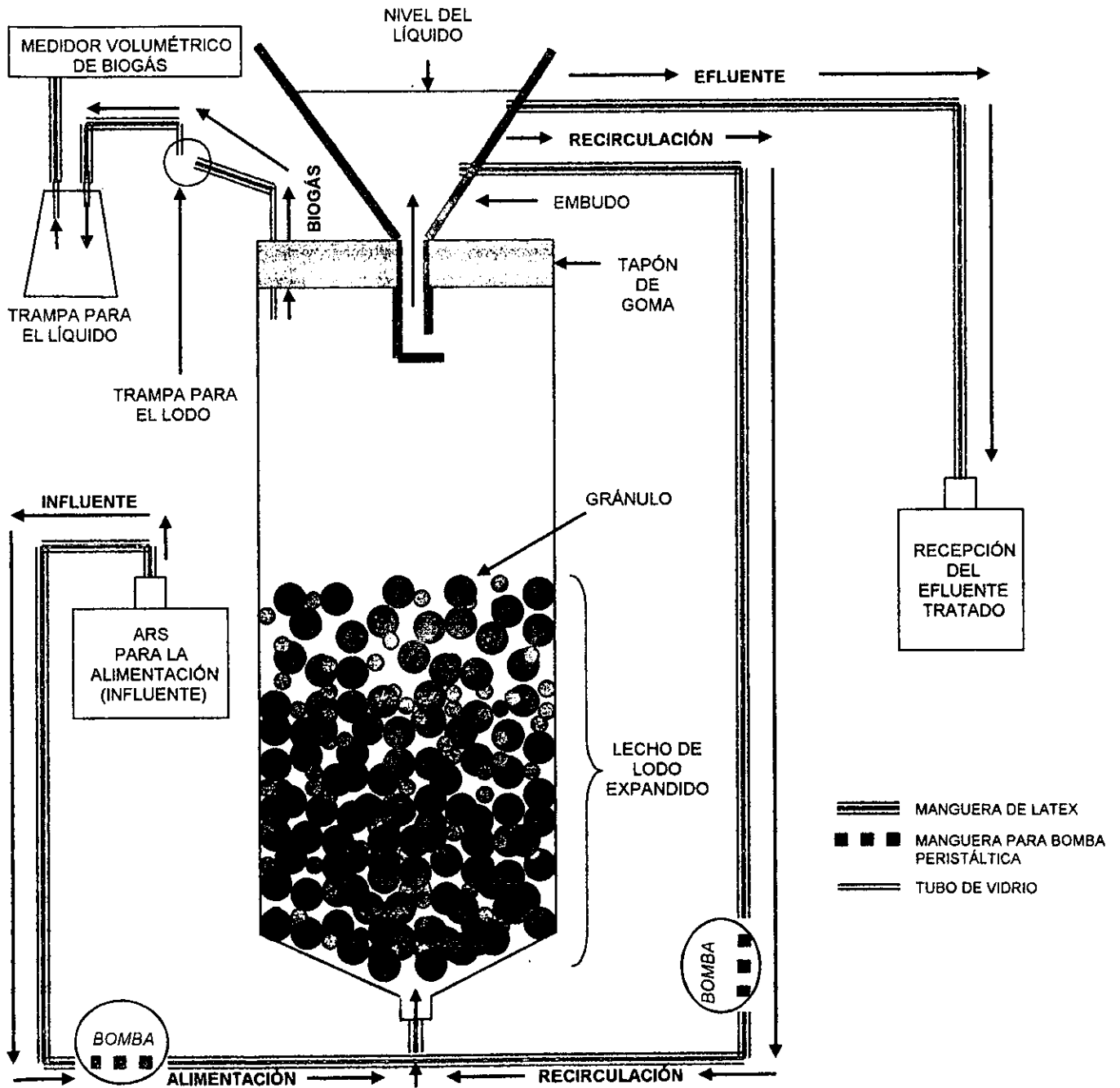
Para poder observar los gránulos de azufre dentro de la bacteria filamentosa, se tomó cada semana una muestra del efluente ubicado en la parte superior del reactor hasta observar dichos gránulos en el microscopio óptico.

Implementación y condiciones iniciales del reactor tipo EGSB

Se construyó un reactor tipo EGSB con un tubo de acrílico que medía 44 cm de altura y 8 cm de diámetro, el volumen de líquido de trabajo fue de 2.2 L. El reactor fue inoculado con 750 mL de lodo granular anaerobio (46.36 g de SSV/L) tamizado con una malla de 0.4 mm y alimentado con el ARS. El tiempo de residencia hidráulico (TRH) fue de aproximadamente un día con un flujo de alimentación de 1.47 mL/min y un flujo de recirculación de 108 mL/min, para generar una expansión del lecho de lodo igual al 50% del volumen original. Este reactor fue operado continuamente en un cuarto a una

temperatura controlada de 35°C. En la Figura 4.2 se muestra el diagrama del reactor tipo EGSB, cabe mencionar que el diagrama no está a escala.

FIGURA 4.2. Diagrama del reactor tipo EGSB (EXPANDED GRANULAR SLUDGE BLANKET) o LLGE (LECHO DE LODO GRANULAR EXPANDIDO) usado para la aclimatación del lodo granular anaerobio al colorante azo marino terasil



Durante la primera semana de la etapa de arranque del reactor tipo EGSB, el TRH inicial fue de 1.5 d y la concentración de glucosa en el ARS fue de 1.85 g/L (10 mM). A la segunda semana, la concentración de glucosa en el ARS fue disminuida a 0.926 g/L (5mM) y, a la tercera semana, se redujo el TRH a 1d. Estas últimas condiciones fueron las que prevalecieron durante la etapa de aclimatación del lodo granular anaerobio al colorante azo.

Métodos analíticos

I. Cuantificación de gases

La producción de gases fue cuantificada en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard HP 6890 equipado con una columna PORAPAK-N y un tamiz molecular con un detector de conductividad térmica. El gas portador fue helio a un flujo de 40 mL/min y el volumen de inyección fue de 5 mL de la atmósfera de la botella serológica, para la colecta de la muestra se usó una jeringa pressure-lock de 10 mL. El gas patrón fue una mezcla formada por metano (68%), CO₂ (28%), nitrógeno (2%) y H₂S (2% de moles).

II. Cuantificación de ácidos grasos volátiles (AGV)

Los AGV se analizaron mediante un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 (Packard Series II), que usaba como patrones ácidos grasos de 2 hasta 6 carbonos. El tratamiento previo de las muestras consistió en añadirles 0.4 mL de ácido fosfórico al 20%, para después filtrarlas a través de filtros de nitrocelulosa de 22 µm y 13 mm de diámetro.

III. Cuantificación de glucosa

La glucosa residual en el sobrenadante de las muestras se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que utilizaba una columna para azúcares Iminex HPX-87H (300 x 7.8) Biorad y un detector de índice de refracción con sensibilidad 8; como eluyente se usó H₂SO₄ 0.01 N a un flujo de 0.7 mL/min. Para la curva patrón de glucosa se manejaron concentraciones de 185.2, 370.4, 555.6, 740.8 y 926 mg/L, equivalentes a 1, 2, 3, 4 y 5 mM.

IV. Cuantificación de aminas aromáticas

Se utilizó el método colorimétrico reportado por Oren y col. (1991), el cual se fundamenta en que las aminas aromáticas reaccionan con el 4-dimetilaminobenzaldehído (4DMAB) para producir un complejo colorido. El procedimiento consistió en centrifugar 5 mL de la muestra problema a 3,500 rpm durante 20 min, al término del tiempo se transfirieron 200 µL del sobrenadante a tubos de 15 mL con rosca que contenían 800 µL de agua; posteriormente se añadieron consecutivamente y por separado 50 µL de HCl 1M, 3 mL de etanol absoluto, 0.5 mL de 4DMAB al 5% en etanol (si hubieran aminas aromáticas se produciría un color amarillo limón) y 0.5 mL de ácido cítrico al 15.7% en NaOH al 6% (se produce turbiedad); después, se agitó y dejó reposar durante 10 min; para, finalmente, adicionar 2.5 mL de agua destilada (desaparece la turbiedad), agitar rápidamente y medir inmediatamente la absorbancia a 440 nm; el blanco no contuvo muestra. La concentración de las aminas aromáticas, se calculó sobre la base de una curva patrón de anilina y una relación de los pesos moleculares entre la anilina y las aminas aromáticas, que se generarían a partir del marino terasil, para hacer un ajuste a las cantidades detectadas con la técnica.

V. Cuantificación del anillo aromático

La absorción del anillo aromático se realizó con la metodología reportada por Donlon *et al.* (1995), usando una curva patrón de ácido benzoico. El barrido de cada muestra se realizó en el intervalo de 200 a 270 nm con celdas de cuarzo de 1 cm. Cada muestra fue diluida (1 en 20) en una solución amortiguadora de fosfatos (pH = 7.0) para obtener absorbancias menores a 0.8 unidades. Adicionalmente, para verificar la naturaleza de los picos detectados, a cada muestra, después de ser analizada, se le añadió por separado 50 mg/L de ácido benzoico y de anilina con el propósito de observar si se incrementaba el pico original de la muestra. La concentración del anillo aromático, se calculó sobre la base de la curva patrón de ácido benzoico, restando la absorbancia del control y realizando una relación de los pesos moleculares entre dicho ácido y los derivados del ácido benzoico, que se generarían a partir de las aminas aromáticas, para hacer un ajuste a las cantidades detectadas con la técnica.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Antes de iniciar la aclimatación del lodo al marino terasil, se verificó la adsorción inicial del colorante por el lodo, para posteriormente realizar la aclimatación.

4.3.1. Adsorción del colorante marino terasil por el lodo granular anaerobio en el ARS

La adsorción del colorante por el lodo granular anaerobio intacto y esterilizado se muestra en la Tabla 4.2. Los resultados indicaron que la adsorción del colorante por el lodo en el ASR fue siempre mayor con el lodo granular intacto (0.03 mg de marino terasil/g SSV-min) que con el lodo granular esterilizado; esta diferencia de adsorción observada podría deberse a la presencia de una gran cantidad de gránulos tipo 2 descritos por Famá (1998) a partir de observaciones al microscopio electrónico realizadas al lodo granular anaerobio proveniente de la misma fuente. Este tipo de gránulo presenta cavidades, que aumentarían la superficie disponible para la adsorción del colorante dentro del lodo intacto, mientras que en el lodo esterilizado dichas estructuras fueron alteradas, afectándose la adsorción del colorante.

TABLA 4.2. Adsorción del colorante azo marino terasil

TRATAMIENTO	COLORANTE NO ADSORBIDO ^a (mg/L)	COLORANTE ADSORBIDO ^b (mg/L)
ARS	22.3	-----
ARS + LODO INTACTO	3.8	22.5
ARS + LODO ESTERILIZADO	10.7	15.1

a. La concentración inicial del colorante fue 25 mg/L, medido como DQO

b. La desorción del colorante se realizó con metanol absoluto

Esta adsorción inicial disminuirá conforme se saturan los sitios disponibles para la adsorción del colorante en los gránulos y se llegue a un equilibrio adsorción-desorción.

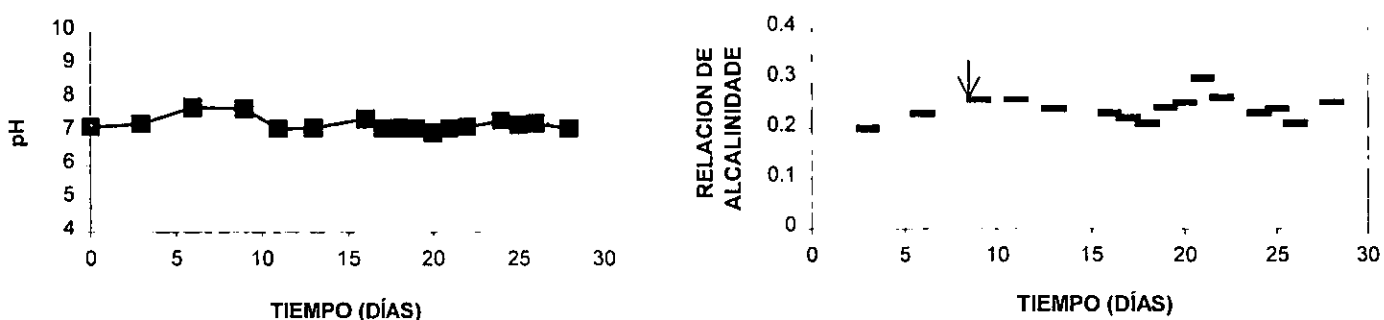
4.3.2. Aclimatación del lodo en un reactor tipo EGSB sulfatorreductor

La aclimatación del lodo se determinó mediante la cuantificación de la degradación parcial del colorante azo, generación de aminas aromáticas y DQO; adicionalmente, fueron evaluados la alcalinidad, glucosa, AGV, absorción del anillo aromático, sulfatos y pH. Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

Comportamiento de la alcalinidad y pH

El pH del efluente con un valor inicial de 7.15 mostró una elevación posterior hasta valores de 7.7, los cuales descendieron y se estabilizaron en un intervalo comprendido entre 7.0 y 7.3, o sea, dentro de los valores óptimos para la digestión, que van de 6.8 a 7.8; en la Gráfica 4.1 se presenta la evolución del pH en el reactor tipo EGSB. Dentro del intervalo de 7.0 a 7.3 y con la presencia de sulfato en el medio, las bacterias metanogénicas acetotróficas (BMA) no pueden competir con las bacterias sulfatorreductoras acetotróficas (BSA), por lo que se supone que el acetato fue consumido principalmente por las BSA. Con relación al propionato, su oxidación fue determinada por la relación DQO/SO_4^{2-} . En el caso de una relación $DQO/SO_4^{2-} = 10$, predomina una ruta sintrófica, en donde participan bacterias acetógenas (OHPA-P) acoplada a la sulfato-reducción de las BSA. Por otra parte, el butirato fue oxidado por las bacterias acetógenas OHPA-B, ya que éstas pueden competir perfectamente con las BSA a concentraciones, bajas y altas, de sulfato (Visser, 1995).

En relación con la alcalinidad en el reactor, durante la aclimatación se observó una ligera tendencia hacia la acidez, obteniéndose valores superiores a 0.25 en la relación de alcalinidades, que es indicativo de un incremento de acidez en el reactor y cuyo efecto no se refleja inmediatamente en el pH sino poco tiempo después. Este fenómeno es común en la etapa de arranque de los reactores anaerobios con suministro de alguna fuente de carbono fácil de metabolizar como la glucosa, ya que la metabolización de ésta es más rápida que la oxidación de los AGV (acético, propiónico y butírico), que se producen al metabolizarla y acidifican el medio.



Gráfica 4.1. Comportamiento del pH y de la relación de alcalinidades durante la aclimatación del lodo granular anaerobio al colorante azo marino terasil en un reactor tipo EGSB bajo condiciones sulfatorreductoras. La flecha indica la adición de 1.5 g de bicarbonato de sodio por litro de agua residual sintética, para amortiguar la alcalinidad del sistema

Para evitar el incremento de dicha acidez se incluyó en la formulación del medio 1.5 g/L de bicarbonato de sodio y con esta medida se evitó que la relación de alcalinidades aumentara por arriba de 0.25 (ver Gráfica 4.1). El comportamiento de la relación de alcalinidades al final de la

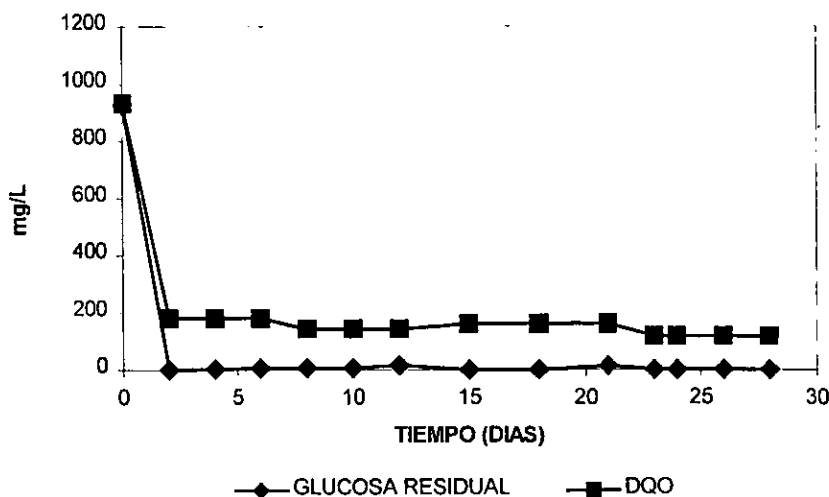
aclimatación indicó que el catabolismo de la glucosa y la oxidación de AGV dentro del sistema se encontraban en equilibrio, lo que conduciría a la estabilización del pH en el reactor.

Remoción de la demanda química de oxígeno (DQO)

La DQO que se suministró al reactor en el ARS fue de 931 mg O₂/L, siendo la mayor parte debida a la glucosa (904.6 mg O₂/L) y el resto al colorante marino terasil (26.6 mg O₂/L). Debido a que los valores de la DQO en el efluente fueron superiores a 100 mg O₂/L y mayores al valor de la DQO del colorante azo, este parámetro no representó una medida confiable que indicara con certeza la degradación del colorante. Cabe mencionar que el valor de DQO para los 20 mg/L del colorante azo marino terasil fue extrapolado a partir de valores mayores a 50 mg/L, ya que a menores concentraciones la técnica no permitía la estimación de valores. En la Gráfica 4.2, que muestra la DQO del efluente durante la aclimatación del lodo en condiciones sulfato-reductoras, se observa que la DQO fue removida hasta menos de 200 mg O₂/L. Este valor de DQO obtenido hace pensar que aún hay materia orgánica en el medio, pero si la glucosa fue casi totalmente consumida al igual que el colorante, entonces es muy probable que la materia orgánica provenga del consorcio bacteriano, que forma el lodo, ya que existió una pérdida de SSV durante la aclimatación.

Consumo de glucosa

Durante la aclimatación se usó glucosa a una concentración de 5 mM como cosustrato para la degradación parcial del colorante azo marino terasil; en la Gráfica 4.2 se observa que el consumo de glucosa fue casi total ($\leq 99\%$) durante la aclimatación, lo cual confirma una eficiente conversión del cosustrato a AGV. Esta eficiencia está relacionada con el alto porcentaje de bacterias glucolíticas o consumidoras de glucosa contenidas en el lodo granular anaerobio, entre las que podrían encontrarse varios géneros (*Bacillus*, *Clostridium* y *Eubacterium*) reportados como productores de azoreductasas y, por lo tanto, posibles responsables de la degradación parcial del colorante azo marino terasil.



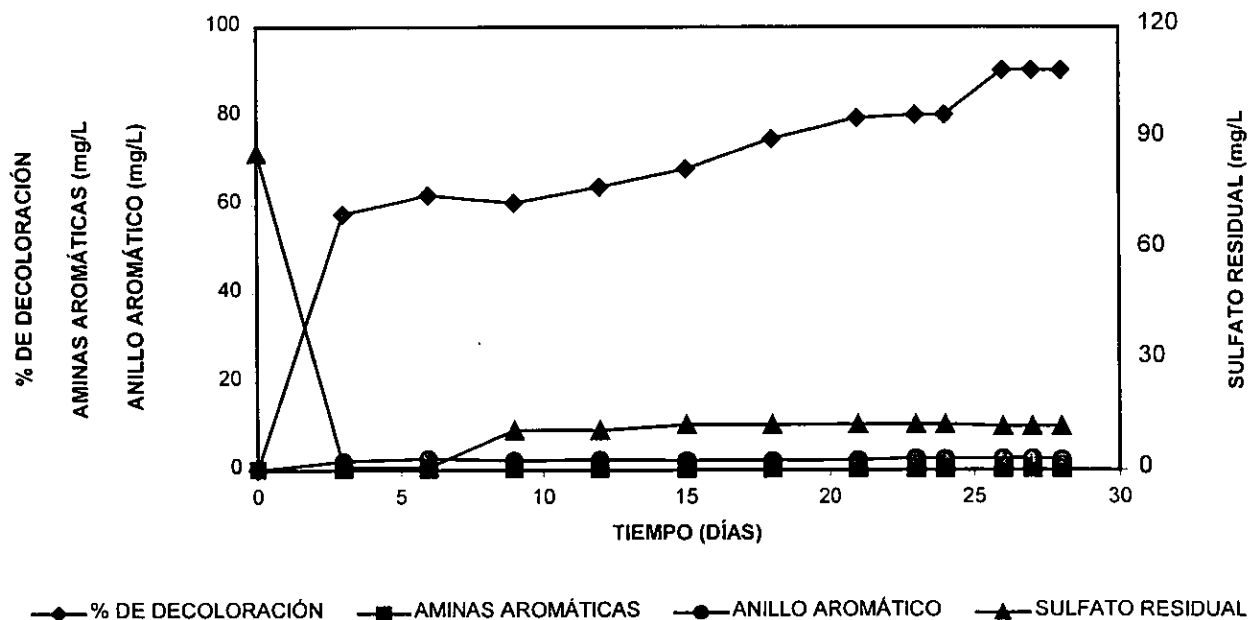
Gráfica 4.2. Cinética del consumo de glucosa y DQO durante la aclimatación del lodo granular anaerobio al colorante azo marino terasil en un reactor tipo EGSB bajo condiciones sulfato-reductoras

Adicionalmente, se analizaron los ácidos grasos volátiles durante la última semana de la aclimatación, encontrándose en el efluente únicamente ácido acético a concentraciones menores a 10 ppm, que confirma la casi total conversión de la glucosa a metano.

A pesar del casi total consumo de la fuente de carbono, las condiciones que fueron utilizadas para la aclimatación del lodo anaerobio al colorante azo marino terasil provocaron un ambiente estresante para el desarrollo de las bacterias que, aunado a las limitaciones de fuentes de carbono y nitrógeno, es decir, a una baja carga orgánica para un reactor tipo EGSB, ocasionaron la reducción de la talla de los gránulos, que se evidenció en la disminución de los SSV (37.5 g/L) al final de la aclimatación.

Mineralización del colorante azo marino terasil

La degradación parcial o decoloración del azocompuesto alcanzó el 90% después de 28 días de aclimatación en condiciones sulfato-reductoras. Durante esta paulatina decoloración no se detectaron aminas aromáticas en el efluente y dado que hubo consumo de sulfato, puede suponerse que fue usado como aceptor de electrones por las bacterias sulfato-reductoras. Considerando que el colorante era la única fuente de nitrógeno en el ARS, quizás la decoloración del marino terasil prosiguió con la desaminación y posterior asimilación del compuesto aromático, tal como se planteó en la hipótesis de este trabajo. Es importante mencionar que fue detectada en el efluente la absorbancia del anillo aromático en concentraciones menores a 3.5 mg/L (ver Gráfica 4.3). Dicha absorbancia no correspondió al intervalo de absorción de la anilina, pero sí al del ácido benzoico, por lo que se concluyó que el anillo aromático detectado podría ser un derivado del ácido benzoico, lo que demostraría que el colorante no fue mineralizado totalmente durante el tiempo en que se desarrolló la aclimatación y podría confirmarse que las aminas aromáticas fueron desaminadas rápidamente, ya que son la única fuente de nitrógeno presente en el ARS.



Gráfica 4.3. Porcentaje de decoloración, generación de aminas aromáticas, detección del anillo aromático y sulfato residual cuantificados durante la aclimatación del lodo granular anaerobio al marino terasil en un reactor tipo EGSB sulfatorreductor

En la Gráfica anterior, se observa que la desasimilación reductiva del sulfato no se completa después del sexto día, ya que su desasimilación depende de relaciones sintróficas con otros grupos bacterianos como los oxidadores de propionato (Visser, 1995).

Con relación a la producción de gases, durante la última semana de la aclimatación se obtuvieron volúmenes de 275 mL/día con una composición de metano igual al 31.06%, nitrógeno de 61.16% y dióxido de carbono de 7.26%. Aunque en las muestras no se detectó ácido sulfhídrico, se percibió un fuerte olor a dicho gas en el depósito para el efluente y en la parte superior del reactor. Esta pérdida de gas quizás fue la responsable de la escasa concentración del gas en las muestras que, a diferencia de los otros gases, suele estar en concentraciones pequeñas y, por lo tanto, puede eliminarse en un sistema abierto como el reactor. Cabe mencionar, que seguramente había una fuga en el reactor, que permitía la entrada de aire, ya que fue detectado nitrógeno en las muestras analizadas y, aunque no se analizó el oxígeno, este sin duda existió y pudo participar en el metabolismo de las bacterias facultativas presentes en el lodo.

Por otra parte, hubo pérdida de azufre en el medio debido a que la presencia de sulfuros permitió la proliferación de bacterias filamentosas en la parte superior del reactor y en el depósito del efluente, donde existe cierta cantidad de oxígeno necesario para el metabolismo de dichas bacterias, que oxidan el H_2S (producido durante la sulfato-reducción) en presencia de oxígeno, para formar azufre.

Observaciones al microscopio óptico determinaron la presencia de la bacteria filamentosa *Thiothrix* sp., tanto en la fase líquida de la parte superior del reactor como en el efluente recolectado; su morfología consistió en filamentos rectos o ligeramente curvados, largos (hasta 500 μm de longitud) y gruesos (aproximadamente 2.5 μm de diámetro), rectangulares y con septos celulares. Adicionalmente, algunas bacterias presentaron en el citoplasma pequeños gránulos de azufre casi imperceptibles, por lo que se tomó una muestra del efluente del reactor cada semana hasta que fue posible observar los gránulos de azufre dentro de las bacterias. Además, la prueba de tinción de Gram reveló bacterias Gram-negativas. Dichas características indicaron la presencia de la especie *Thiothrix* tipo I (ver Imagen 4.1).



IMAGEN 4.1. Imagen al microscopio óptico de las bacterias filamentosas identificadas como *Thiothrix* tipo I

La presencia de estas bacterias quizás influyó sobre los niveles de glucosa y AGV detectados en el efluente y en la descomposición microbiológica que genera compuestos inocuos en el medio del reactor tipo EGSB, ya que requiere para proliferar de derivados del azufre (reducidos) como el H_2S . La remoción de dicho ácido en el reactor por medio de las bacterias filamentosas amortiguaría el efecto tóxico del H_2S , ya que su toxicidad a un pH entre 7.0 y 7.3 depende de su concentración y no de sus iones (Visser, 1995).

CAPÍTULO 5. Mineralización del colorante azo marino terasil por un lodo granular anaerobio en condiciones intermitentes ("batch") sulfato-reductoras

5.1. INTRODUCCIÓN

El amplio uso de los colorantes azo en la industria textil y las pérdidas del colorante durante el proceso de teñido, han ocasionado que las aguas residuales de dicha industria contengan concentraciones perceptibles de azocompuestos, que suelen ser degradados parcialmente en los cuerpos de agua y sedimentos, generando aminas aromáticas carcinogénicas para los mamíferos. Esta situación, aunada a la escasa e inadecuada legislación ambiental mexicana, que regula las descargas de aguas residuales textiles a ríos y arroyos, ocasiona la contaminación de los cuerpos de agua y mantos acuíferos, poniendo en riesgo la salud de la fauna y poblaciones humanas.

Esta problemática ha conducido al desarrollo de procesos biológicos para el tratamiento de aguas residuales textiles con el objetivo de lograr la mineralización de los colorantes azo, es decir, su completa biodegradación. Estos procesos deben garantizar la completa degradación del colorante azo, ya que de lo contrario podrían generarse compuestos carcinogénicos.

En el capítulo anterior se describió la mineralización del marino terasil por un lodo anaerobio en un reactor tipo EGSB sulfato-reductor. Para verificar tal hecho se diseñó un experimento intermitente ("batch") con el objetivo de tener un sistema cerrado para estudiar la biodegradación del azocompuesto bajo las mismas condiciones sulfatorreductoras y corroborar lo observado durante la aclimatación.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación sólo se indican los materiales y métodos novedosos con respecto a los indicados en los anteriores capítulos.

Material biológico

Se usó el lodo granular anaerobio aclimatado al colorante marino terasil en un reactor tipo EGSB sulfatorreductor.

Medios de cultivo

El medio de cultivo utilizado fue el reportado por Donlon y col. (1996), pero modificado tal como se indicó en el capítulo 3.

Métodos analíticos

I. Cuantificación de carbono orgánico total

La cuantificación del carbono orgánico, carbono inorgánico y carbono total en el sobrenadante, fue realizada filtrando cada muestra en un filtro de fibra de vidrio con diámetro de poro de 1 μm en promedio; posteriormente, el filtrado se colocó en tubos para cuantificar el carbono en un equipo de

análisis de carbono orgánico total TOK 5050. La acidificación de las muestras para medir el carbono inorgánico lo hacía automáticamente el aparato mediante una solución de ácido forfórico hasta lograr un pH de aproximadamente 2.0 en cada muestra.

II. Cuantificación de sulfuros

La determinación de sulfuros se realizó mediante un electrodo selectivo ORION, que eliminaba las interferencias asociadas a los procedimientos colorimétricos y ni el color ni la turbidez afectaban la medida. Si la muestra (10 mL) iba a ser cuantificada inmediatamente se hacía sin preparación de la misma, pero si la muestra se almacenaba, se agregaban 10 mL de una solución amortiguadora anti-oxidante, elaborada con 600 mL de agua destilada, 200 mL de NaOH 10 M, 35 g de ácido ascórbico y 67 g de EDTA-sal sódica, todo aforado a un litro y refrigerado a 4°C. El patrón de sulfuros fue preparado disolviendo aproximadamente 10 g de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de agua destilada, posteriormente, a dicha disolución se le agregaron 500 mL del amortiguador antioxidante y fueron aforados a un litro. Este patrón (25 mL) fue valorado con una solución estándar de $\text{Pb}(\text{ClO}_4)_2$ 0.1 M, usando como indicador un electrodo de plata/sulfuros.

III. Cuantificación de nitrógeno amoniacal

Este parámetro fue medido mediante un electrodo de amonio ORION, que no presentaba interferencias por color o turbidez; este electrodo usaba una membrana permeable a los gases, para separar la muestra del relleno interno del electrodo. Cada muestra (10 mL) fue alcalinizada con NaOH 5M, para que el amonio de la muestra, desprendido en forma de amoniaco en el medio básico, se difundiera a través de la membrana en proporción a su concentración. La calibración del electrodo se realizó con patrones de concentración que iban de 0.05 hasta 100 ppm.

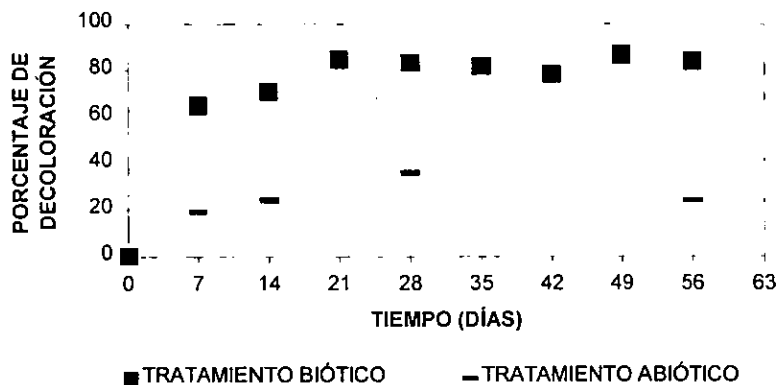
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al concluir la aclimatación del lodo granular anaerobio al marino terasil se procedió a realizar las pruebas intermitentes ("batch") en botellas serológicas para tener un sistema cerrado y poder estudiar con más detalle el proceso de biodegradación del colorante azo.

Degradación parcial o decoloración

La decoloración durante las pruebas intermitentes ("batch") de mineralización del marino terasil se midió mediante espectrofotometría y el cálculo se realizó tal como se indica en materiales y métodos. Los tratamientos que sirvieron como controles fueron para determinar la reducción abiótica del colorante, que ya se había observado al analizar la estabilidad del colorante en el medio de cultivo para las pruebas intermitentes (ver capítulo 3). Los resultados obtenidos en cada tratamiento se muestran en la Gráfica 5.1, donde se observa que la reducción abiótica alcanzó el 24% a los 14 días de la prueba, mientras que la reducción biótica logró más del 60% en el mismo periodo. El hecho de que la reducción abiótica del enlace azo alcanzará el 24%, no quiere decir que el lodo realiza sólo poco más del 35% de la decoloración, ya que en la Gráfica 5.1 se hace evidente una notoria diferencia en las pendientes de decoloración para ambos tratamientos durante la primera semana; siendo la reducción biótica más rápida que la abiótica.

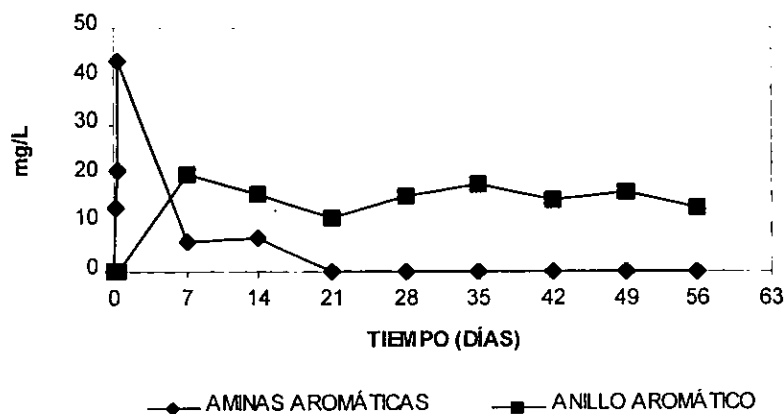
Además, se observó que la degradación parcial del marino terasil se realizó durante las primeras 3 semanas de la prueba y se mantuvo hasta el final (8 semanas) con un porcentaje de decoloración superior al 80%.



Gráfica 5.1. Cinética de la degradación parcial del colorante azo marino terasil durante la prueba de mineralización. Todos los controles iniciales indicaron 0% de decoloración

Generación de aminas aromáticas y presencia de anillo aromático

La generación de aminas aromáticas durante la degradación parcial del colorante o decoloración fue medida por el método colorimétrico de Oren y col. (1991), obteniéndose que durante la primera semana se generaron hasta 42.9 mg/L de aminas aromáticas, que corresponden a la cantidad de colorante reducido (42.5 mg/L). Casi toda esta cantidad de aminas aromáticas desapareció del medio en la misma semana hasta no ser detectada a los 21 días de la prueba. La desaparición de dichas aminas coincidió con la detección de la absorbancia producida por el anillo aromático dentro del intervalo correspondiente al ácido benzoico (ver Gráfica 5.2).



Gráfica 5.2. Cinéticas de la generación de aminas aromáticas y aparición del anillo aromático en el sobrenadante de las muestras analizadas durante la prueba de mineralización del colorante azo marino terasil. Los tres primeros puntos de la cinética de las aminas aromáticas corresponden a las tres primeras horas de la prueba

Sin embargo, la cantidad de anillo aromático detectada después de la tercera semana (20.6 mg/L) más las aminas aromáticas residuales (6 mg/L) en la primera semana, no representaban los 42.5 mg/L de marino terasil, que resultaron del 85% de la degradación parcial del colorante; por lo que cabría suponer que sólo un tipo de amina aromática fue asimilado, permaneciendo la otra en el medio de cultivo.

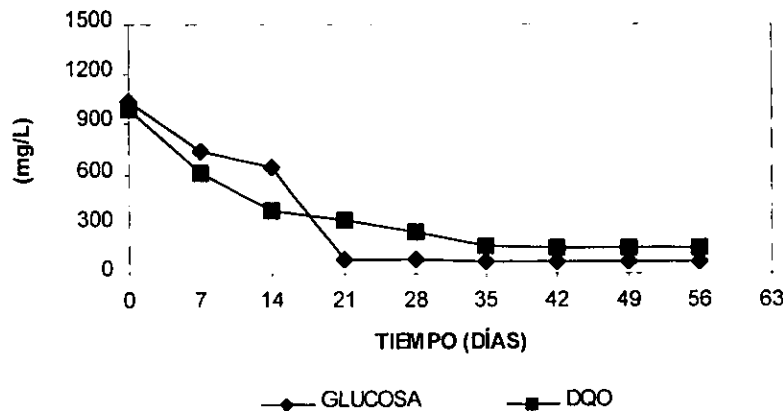
Un caso similar fue reportado por Razo-Flores (1997), quien observó que durante la biodegradación del colorante azo anaranjado mordente 1, por un lodo granular anaerobio en condiciones metanogénicas, sólo se asimiló una de las dos aminas aromáticas generadas, el ácido 5-aminosalicílico, mientras que el 1,4-fenilendiamina no fue degradado.

Es importante mencionar que la desaminación reductiva de la anilina por *Desulfobacterium anilini* implica una carboxilación del anillo aromático previa a la desaminación (Schnell y Schink, 1991), por lo que es factible que el resultado de la desaminación de las aminas aromáticas generadas a partir del marino terasil sean derivados del ácido benzoico, ya que se considera que ambas aminas fueron introducidas al citoplasma de las bacterias sulfatorreductoras y fueron desaminadas puesto que no se detectan aminas después de 21 días, pero quizás sólo una pudo ser degradada.

En relación con la amina degradada, ésta posiblemente fue catabolizada por la ruta anaerobia de degradación del benzoato, que ha sido descrita para los principales grupos bacterianos presentes en el lodo, es decir, fermentativas, sulfatorreductoras y metanógenas. Por otra parte, los reportes existentes relacionados con la remoción de radicales en un compuesto aromático indican que cualquier radical puede ser removido por el metabolismo anaerobio (Young, 1984).

Análisis de carbono

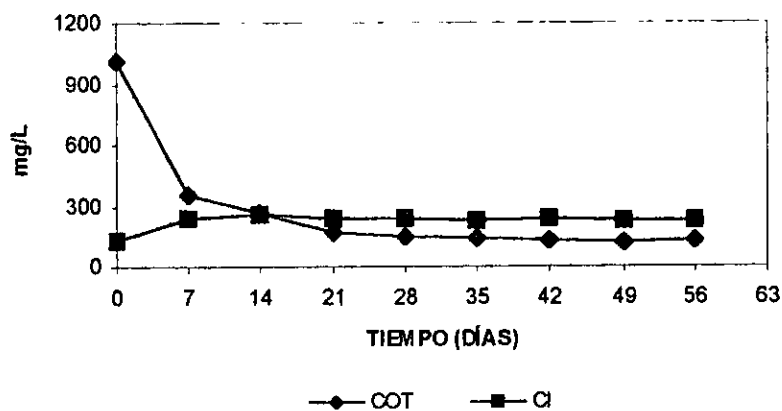
La principal fuente de carbono en el medio de cultivo fue la glucosa, la cual fue determinada por cromatografía líquida (HPLC), obteniéndose una notable disminución después de 21 días de haber iniciado la prueba; en la Gráfica 5.3 se indica la cinética del consumo de glucosa. Por otra parte, el análisis de la DQO se realizó de manera complementaria al consumo de glucosa e indicó una remoción del 85% con una tendencia similar a la obtenida con el carbohidrato (Gráfica 5.3).



Gráfica 5.3. Cinética del consumo de glucosa y DQO durante las pruebas intermitentes ("batch") de mineralización del colorante marino terasil

La asimilación de la glucosa en los primeros 21 días coincidió con la presencia en el medio de ácidos grasos volátiles (AGV), específicamente ácidos acético y propiónico, que fueron detectados durante el primer día de la prueba en concentraciones de 92 y 22 mg/L respectivamente. Estos AGV fueron totalmente asimilados hasta la tercera semana. Con relación a su asimilación, se ha reportado que la competencia por acetato en condiciones sulfatorreductoras depende del pH, en un intervalo de 6.9 a 7.7 y a bajas concentraciones de sulfatos las bacterias metanogénicas acetotróficas (BMA) pueden competir con las bacterias sulfatorreductoras acetotróficas (BSA). De acuerdo a lo anterior y al valor del pH en el medio, que estuvo entre 7.63 y 7.41, las BMA contenidas en el lodo pudieron competir con las BSA, principalmente después de la disminución del sulfato en el medio (primera semana). Respecto a la competencia por propionato, ésta depende del ratio DQO/SO₄, y siendo el ratio DQO/SO₄≈10, la degradación de propionato fue realizada por bacterias acetógenas (OHPA-P) de manera acoplada a la utilización del hidrógeno generado, que sería usado durante la sulfatorreducción. Es importante mencionar que quizás no se detectó butirato en el medio porque fue degradado durante la primera semana, ya que los oxidadores sintróficos de butirato (OHPA-B) pueden competir con las bacterias sulfatorreductoras sin importar la concentración de sulfato en el medio (Visser, 1995).

Respecto del carbono total, constituido por el carbono orgánico total (COT) y el carbono inorgánico (CI), el análisis automatizado mostró desde la primera semana una importante disminución del carbono orgánico total como resultado de la asimilación de la glucosa y su conversión hasta metano (ver Gráfica 5.4), ya que durante los primeros 7 días se generó el 78% del total de metano producido durante toda la prueba (ver más adelante Tabla 5.1). Por otra parte, el CI duplicó los 124 mg/L iniciales (ver Gráfica 5.4), lo cual pudo deberse a la producción de CO₂ por parte del metabolismo de las sulfato-reductoras y metanogénicas; este incremento también se hizo evidente en la atmósfera de las botellas, ya que se registró un incremento en la cantidad de CO₂ a partir de la primera semana de la prueba (ver Tabla 5.1).



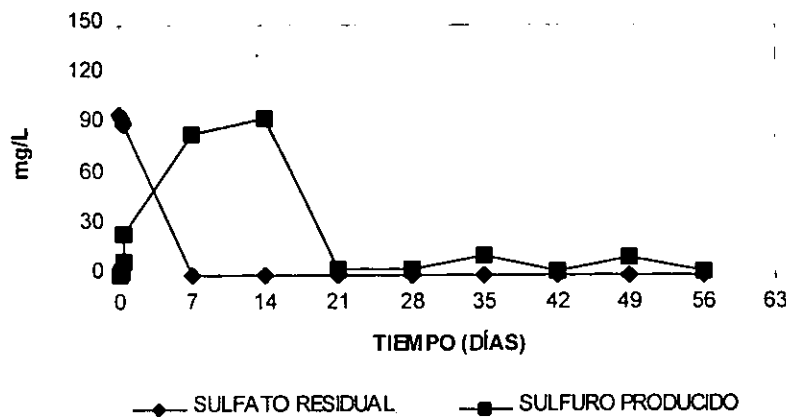
Gráfica 5.4. Cinéticas del carbono orgánico total (COT) y carbono inorgánico (CI) durante la prueba de mineralización del colorante azo marino terasil

En la gráfica anterior, se observa que la remoción de COT es del 80%, muy similar al porcentaje obtenido a partir del consumo de glucosa y remoción de la DQO. La mayor parte del COT removido se realizó durante los primeros 21 días de la prueba, tal como ocurrió con la glucosa y que coincidió con la máxima decoloración alcanzada y con la desaparición del grupo amino de las aminas

aromáticas en el medio. Todo esto parece indicar que el catabolismo de la glucosa está relacionado con la reducción del enlace azo y con la desaminación reductiva de las aminas aromáticas. Si esto es así, cabría suponer que el acetato derivado de la metabolización de la glucosa serviría como donador de electrones para las bacterias sulfato-reductoras y, teniendo sulfato como aceptor, podrían originarse las condiciones para la utilización del grupo amino como fuente de nitrógeno.

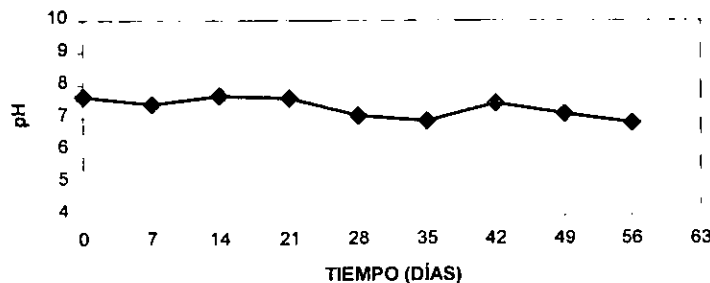
Consumo de sulfato y generación de sulfuros

Los resultados de la reducción del sulfato indicaron que durante la primera semana de la prueba se consumió todo el sulfato contenido en el medio, ya que no se encontró sulfato en el sobrenadante de las muestras analizadas, simultáneamente fue apareciendo sulfuro en el medio desde el primer día de la prueba, alcanzando su máxima cantidad a partir de la segunda y desapareciendo después de 21 días (ver Gráfica 5.5), que coincidió con la aparición de H_2S en la atmósfera de las botellas (ver Tabla 5.1).



Gráfica 5.5. Cinéticas del consumo de sulfato y generación de sulfuros durante la mineralización del colorante azo marino terasil

En la gráfica anterior, se observa que los sulfuros disueltos en el medio permanecen hasta la tercera semana y considerando que el valor del pH en el medio fue entre 7.63 y 7.41 durante este período (ver Gráfica 5.6), entonces el posible efecto tóxico del sulfuro fue prolongado, ya que a dicho valor del pH, las bacterias acetotróficas metanógenas y acetotróficas sulfatorreductoras son inhibidas de igual manera para degradar el acetato (Visser, 1995).



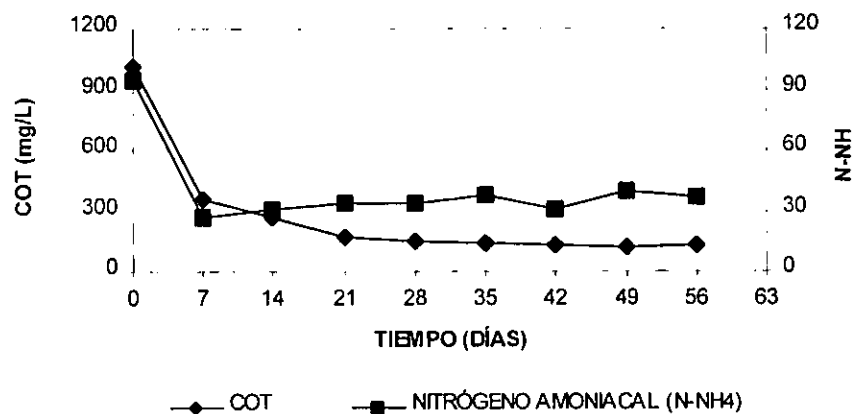
Gráfica 5.6. Comportamiento del pH durante la prueba de mineralización del colorante azo marino terasil

El hecho de que el pH se mantuviera dentro de los intervalos adecuados para la digestión (ver Gráfica 5.6), se debió a que el medio de cultivo contenía en su formulación un amortiguador y a que el lodo fue previamente aclimatado bajo las mismas condiciones de glucosa y sulfato, que son los compuestos que podrían afectar el valor del pH mediante la generación de AGV y ácido sulfhídrico.

En la Gráfica 5.6 se puede observar que, aunque existen pequeños cambios en el valor del pH, éste mantiene una tendencia a ubicarse cerca de 7.4, lo que conduciría a un efecto tóxico por parte de H₂S como tal y no por los productos de su disociación.

Consumo de nitrógeno amoniacal y su posible relación con la remoción del COT

El nitrógeno amoniacal disminuyó hasta un promedio de 35 mg/L durante la primera semana y se mantuvo hasta el final de la prueba sin ser asimilado totalmente (ver Gráfica 5.7).



Gráfica 5.7. Valores del nitrógeno amoniacal y COT durante la mineralización del marino terasil.

En la Gráfica anterior se muestran las cinéticas del nitrógeno amoniacal y el COT con el objetivo de observar que las fuentes de carbono y nitrógeno fácilmente asimilables fueron consumidas de manera similar y rápidamente durante la primera semana y en el momento en que se agotó la fuente de carbono, el amonio ya no fue asimilado. Ahora bien, existe la hipótesis de que la fosforilación que es catalizada por las proteínas del sistema de la fosfotransferasa (PTS por las siglas en inglés de phosphotransferase system) regula la asimilación de carbono y nitrógeno en bacterias mediante la proteína denominada PII, que estaría regulando la expresión genética de la glutamina sintasa (GS), mediante la modulación de la actividad cinasa/fosfatasa de la proteína conocida como NRII o NTRB, que incidiría sobre la transcripción del gen *glnA*; por otra parte, PII regularía la actividad de GS mediante su interacción con la adeniltransferasa, responsable de la adenilación de la GS, que conduciría a su inactivación (Charbit, 1996). Luego entonces, esto podría indicar la existencia de un control sobre la asimilación de fuentes de nitrógeno, que estaría regulada por el sistema PTS.

Producción de gases

La cuantificación de los gases metano, dióxido de carbono, nitrógeno y ácido sulfhídrico se realizó por cromatografía; los resultados obtenidos se indican en la Tabla 5.1, donde se observa que el 78% del total de metano producido (37.19%) fue obtenido durante la primera semana, lo que confirma una

buena conversión del cosustrato (glucosa) hasta metano, esto indica que las bacterias metanogénicas acetotróficas pudieron competir con las bacterias sulfatorreductoras acetotróficas.

En relación con el ácido sulfhídrico, éste fue detectado a partir de la tercera semana y permaneció constante durante el resto de la prueba; la aparición de este gas coincidió con la desaparición del sulfuro en el medio. Sin embargo, esta situación es curiosa, ya que se debió detectar un equilibrio entre la fase líquida y la gaseosa antes de observar todo el gas en la atmósfera de las botellas, pero no ocurrió así. Este tema puede ser objeto de una investigación posterior.

Tabla 5.1. Producción de gases durante la prueba de mineralización del colorante azo marino terasil

TRATAMIENTO ^a	PORCENTAJE DE GASES			
	CH ₄	CO ₂	N ₂	H ₂ S
Control inicial	0.00	4.54	95.46	0.00
7 días	28.87	8.18	62.94	NI
14 días	33.81	8.60	57.58	NI
21 días	33.99	10.48	54.53	1.19
28 días	32.78	11.16	54.19	1.74
35 días	34.94	11.03	52.70	1.29
42 días	34.50	10.43	54.21	1.11
49 días	34.45	10.89	53.23	1.42
56 días	37.19	11.63	49.70	1.47

NI = No Integrado, la cantidad del gas era tan pequeña que no fue integrada por el método utilizado

a = Todos los tratamientos tuvieron una concentración inicial de 50 mg/L del colorante azo marino terasil

CAPÍTULO 6. Efecto de la glucosa sobre la degradación parcial del colorante azo marino terasil por un lodo granular anaerobio en condiciones intermitentes sulfato-reductoras

6.1. INTRODUCCIÓN

El efecto del cosustrato sobre la biodegradación de los colorantes azo por un lodo granular anaerobio en condiciones intermitentes metanogénicas, ha sido reportado por Guerrero y col. (1997), quienes observaron la inhibición de la metanogénesis a concentraciones mayores de 100 mg/L de marino terasil sobre un lodo de la misma fuente que el utilizado en el presente estudio; sin embargo, al adicionar glucosa en el medio de cultivo fue revertido dicho efecto negativo.

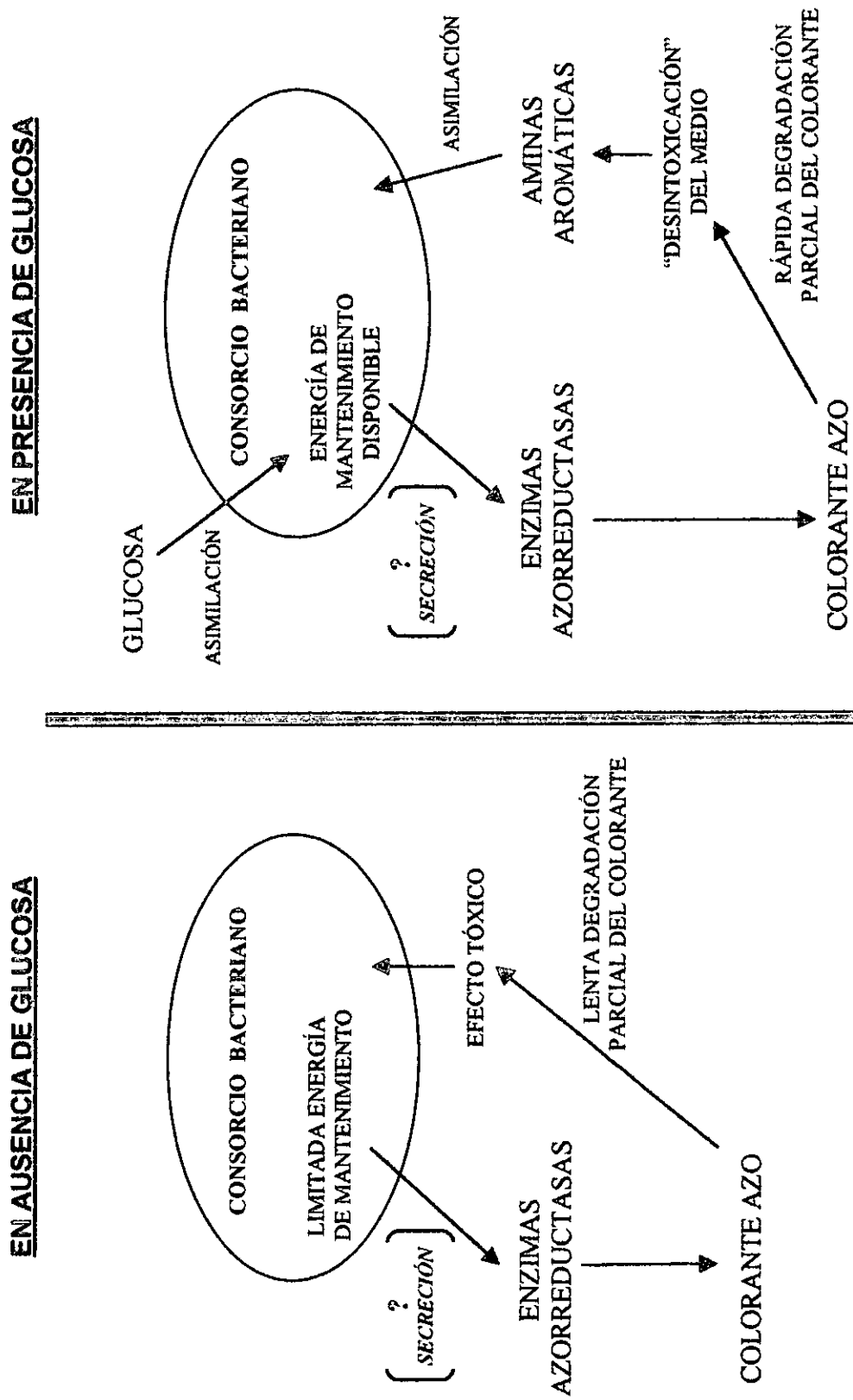
Por otra parte, Razo-Flores (1997) observó que usando como cosustrato glucosa y una mezcla de ácidos grasos (acetato, propionato y butirato) por separado en reactores tipo UASB metanogénicos, se logró la decoloración del anaranjado mordente 1 en un período inicial de 25 días, siendo la glucosa mejor cosustrato que la mezcla de ácidos grasos. Además, la glucosa permitió aumentar la carga o concentración del colorante por arriba de la concentración inhibitoria media sin presentarse dicho efecto negativo.

Este fenómeno, ocasionado por la glucosa, fue interpretado por Razo-Flores como una descomposición microbiológica que genera compuestos inocuos en el medio, por el hecho de que el colorante azo es más tóxico para las bacterias que las aminas aromáticas, que se generan por su rompimiento. Sin embargo, las azorreductasas son enzimas poco específicas, que pueden reducir varios tipos de colorantes azo y grupos nitro en compuestos nitroaromáticos; además, la reducción de azocompuestos puede realizarse mediante flavinas reducidas (Gingell y Walker, 1971). Por consiguiente, podría tratarse de un mecanismo bacteriano para asimilar al colorante como una fuente de carbono cualquiera, ya que en términos evolutivos es difícil suponer que desde la aparición del primer colorante azo (1856) hasta la fecha, las bacterias hayan desarrollado un mecanismo de descomposición para dichos azocompuestos. Al parecer la descomposición es un beneficio adicional. En la Figura 6.1, se muestra la hipótesis que ha sido planteada en este estudio, para explicar el efecto del cosustrato (glucosa) sobre la decoloración del colorante marino terasil.

Según Roxon *et al.* (1966) y Haug *et al.* (1991), quienes estudiaron la reducción de los colorantes azo tartrazina y amarillo mordente 3, respectivamente; la glucosa es un buen donador de equivalentes reductores para cofactores enzimáticos, que participan en el rompimiento del colorante azo vía NAD(P)H o FAD(H)₂ mediante la transferencia de electrones a enzimas azorreductasas para reducir al enlace azo.

Con base en los anteriores antecedentes y considerando que en el capítulo anterior se encontró una relación entre la decoloración del marino terasil y el consumo de glucosa, se diseñó un experimento con el propósito de conocer el efecto de la glucosa como cosustrato sobre la decoloración del marino terasil (50 mg/L) y averiguar si una concentración de 926 mg/L (5 mM) de glucosa permitía incrementar la concentración del colorante hasta 200 mg/L con el objetivo de saber si el efecto de la glucosa permite el aumento de la tolerancia hacia el colorante.

FIGURA 6.1. Hipótesis sobre el efecto del cosustrato (glucosa)



6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

A excepción de algunas modificaciones al medio de cultivo, todos los restantes materiales y métodos ya fueron descritos en los capítulos anteriores.

Medio de cultivo

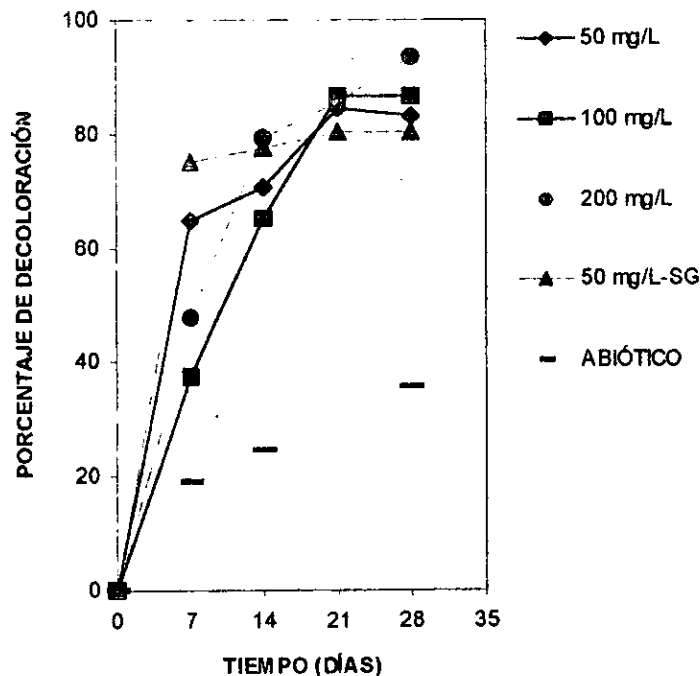
El medio de cultivo usado fue el mismo que se indicó en el capítulo 5, pero con las variantes de la presencia o ausencia de glucosa en el medio para el tratamiento con 50 mg/L de marino terasil y dos tratamientos a concentraciones más altas del azocompuesto (100 y 200 mg/L). La reducción del medio y el procedimiento de inoculación se realizó tal como se indica en el Anexo II.

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos después de 28 días de prueba para observar el efecto de la glucosa sobre la decoloración del marino terasil vía sulfato-reducción en las pruebas intermitentes se presentan a continuación.

Determinación de la degradación parcial o decoloración

La decoloración del colorante azo marino terasil fue medida espectrofotométricamente y los resultados obtenidos se muestran en la Gráfica 6.1.

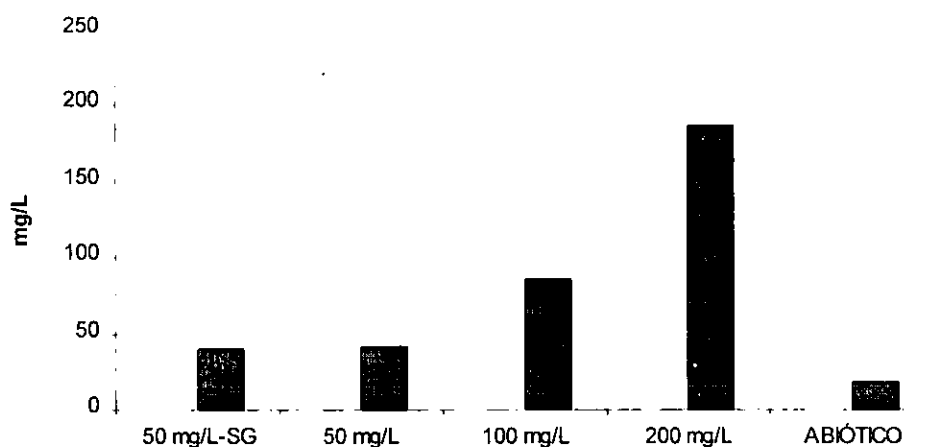


Gráfica 6.1. Cinética de la decoloración del marino terasil durante las pruebas intermitentes. Las siglas SG corresponden al tratamiento sin glucosa y la palabra ABIÓTICO hace referencia al control con el lodo esterilizado

En la gráfica anterior se puede observar que, los tratamientos con 50 mg/L de marino terasil con y sin glucosa produjeron un porcentaje similar de decoloración, luego entonces, la glucosa no es necesaria para el proceso de reducción del enlace azo. El gran porcentaje de decoloración en ausencia del carbohidrato, que alcanzó casi el 80%, podría indicar una secreción de posibles azorreductasas y otras enzimas como un mecanismo para obtener fuentes de carbono. Aunque por otra parte, Gorontzy y col. (1993) observaron, que la presencia de sulfuros en el medio producía la completa reducción del orto-nitrofenol a orto-aminofenol, por lo que existe la posibilidad de que la presencia de sulfuros en el medio de cultivo, detectado desde la primera semana (ver Gráfica 6.4), sea la responsable de parte de la reducción observada en ausencia del carbohidrato.

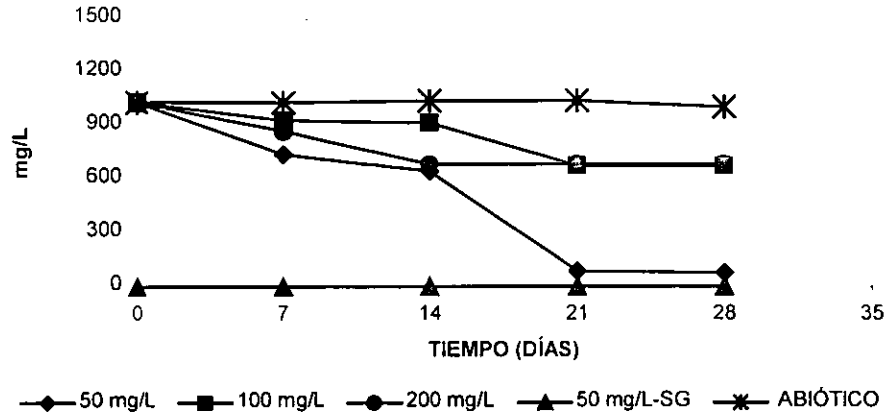
El hecho de que la reducción del marino terasil se realizara tanto en presencia como en ausencia de glucosa no significa que ésta sea prescindible, ya que de su catabolismo depende todo el consorcio contenido en el lodo (ver capítulo 5), incluyendo las bacterias que realizan la reducción, por lo que este cosustrato podría ser un eficaz donador de electrones para todo el sistema.

Respecto del incremento de la tolerancia hacia el colorante marino terasil se observó que, a las concentraciones de 100 y 200 mg/L del colorante, hubo una alta decoloración, medida como porcentaje de decoloración, que resultó muy similar al obtenido con el tratamiento de 50 mg/L del azocompuesto (ver Gráfica 6.1); esto significa que, a concentraciones de 100 y 200 mg/L de marino terasil, la cantidad de colorante reducido de duplicó y cuadruplicó, respectivamente (ver Gráfica 6.2).



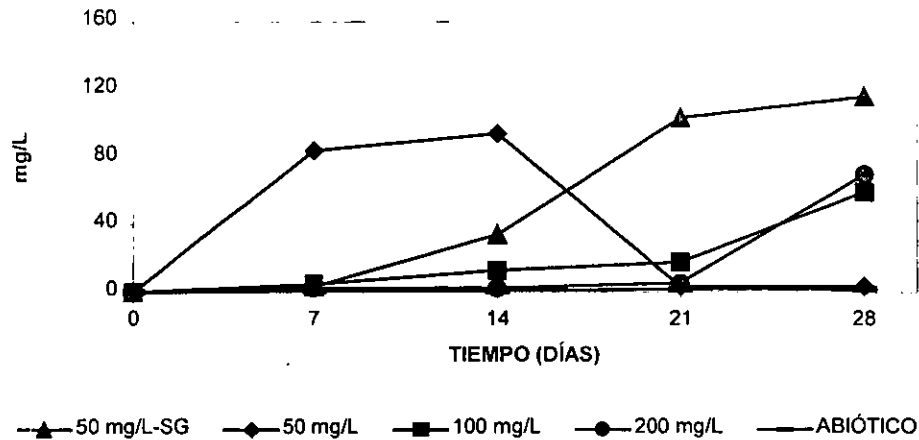
Gráfica 6.2. Cantidad de colorante marino terasil decolorado de acuerdo a su porcentaje de decoloración y concentración del mismo en los diferentes tratamientos. Las siglas SG corresponden al tratamiento sin glucosa y la palabra ABIÓTICO hace referencia al control con lodo esterilizado

Sin embargo, el consumo de glucosa hace evidente que el carbohidrato no participó en la decoloración observada, ya que ambos tratamientos (100 y 200 mg/L) no consumieron ni la mitad de la glucosa presente en el medio (ver Gráfica 6.3). Esto parece indicar que la reducción en ausencia de glucosa realizada por el lodo es la responsable de la decoloración alcanzada; además, parece quedar claro que existe un efecto tóxico del marino terasil sobre el grupo bacteriano glucolítico.



Gráfica 6.3. Cinética del consumo de glucosa durante las pruebas intermitentes.

Dicho efecto tóxico repercutiría en los grupos bacterianos dependientes del metabolismo glucolítico como las bacterias sulfatorreductoras. En la Gráfica 6.4 se observa que, conforme aumenta la concentración del marino terasil, la aparición del sulfuro en el medio tarda más tiempo o no ocurre antes de 20 días, ya que el abastecimiento de donadores de electrones para las bacterias sulfatorreductoras sería más lento. Quizás, también estas bacterias fueron afectadas por el azocompuesto. Por otra parte, la generación de sulfuro en el tratamiento sin glucosa y con 50 mg/L del azocompuesto, aunque más lenta que su contraparte, fue mayor que la obtenida a concentraciones de 100 y 200 mg/L del azocompuesto con glucosa en el medio. Sin embargo, dicho retraso podría no deberse al efecto tóxico sino a la falta de glucosa en el medio.

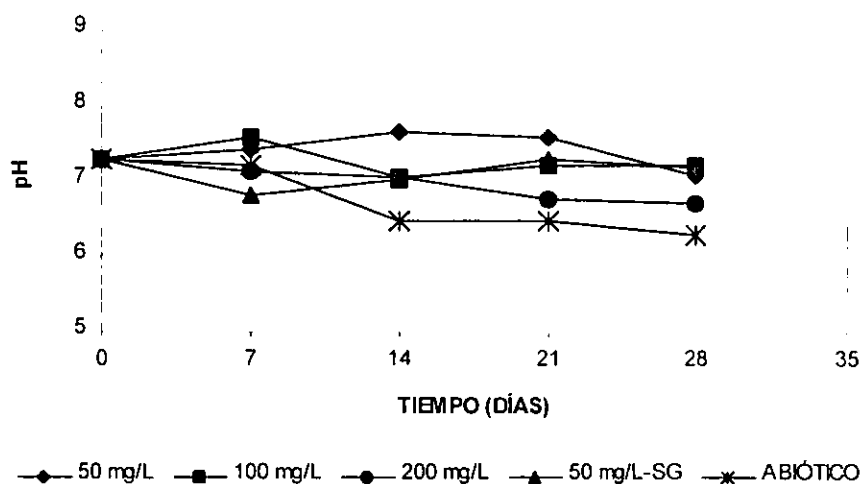


Gráfica 6.4. Cinética de la aparición de sulfuros en el medio de cultivo durante las pruebas intermitentes

En relación con el tratamiento abiótico, no se sabe el grado de participación de la reducción abiótica en los tratamientos bióticos, pero considerando que la reducción biótica se realizó a mayor velocidad que la abiótica (ver Gráfica 6.1), se concluye que, aún con la presencia de sulfuro en el medio, la mayor parte de la reducción fue biótica.

Comportamiento del pH

La evaluación de los datos de pH mostró que, durante toda la prueba este parámetro se mantuvo dentro del intervalo adecuado para la digestión; sin embargo, el tratamiento con 200 mg/L del azocompuesto presentó una paulatina caída del pH desde el inicio de la prueba (ver Gráfica 6.5).



Gráfica 6.5. Comportamiento del pH durante las pruebas intermitentes

El descenso del pH detectado en el tratamiento con 200 mg/L de marino terasil, quizás se debió a un efecto tóxico sobre todo el consorcio bacteriano, lo que provocaría que el pH del sistema no pudiera regularse y, por ende, el catabolismo glucolítico causaría una paulatina acidificación en el medio.

CAPÍTULO 7. Identificación del grupo bacteriano involucrado en la actividad enzimática azorreductora

7.1. INTRODUCCIÓN

La reducción enzimática del colorante azo realizada por bacterias de la flora intestinal ha sido ampliamente reportada (ver Tabla 2.9), debido al uso de dichos colorantes en la industria farmacéutica y alimenticia, lo cual implica la ingestión potencial de compuestos carcinogénicos, ya que al reducirse el azocompuesto se generan aminas aromáticas (Chung y col., 1992). Por otra parte, Raffi y Cerniglia (1993) y Raffi y col. (1990, 1991), reportaron 10 cepas de bacterias anaerobias, aisladas de heces humanas, capaces de reducir colorantes azo. Entre los géneros involucrados estuvieron *Clostridium*, *Eubacterium*, *Butyrivibrio* y *Bacteroides*; la actividad azoreductasa detectada fue inhibida por oxígeno y 7 de las cepas requirieron de una flavina para desarrollar dicha actividad. En este mismo estudio se observó que las diferentes cepas producían por lo menos 3 tipos de azoreductasas, que eran producidas de manera constitutiva y secretadas al ambiente extracelular. En un trabajo posterior, donde se enfocaron en los géneros *Clostridium* y *Eubacterium*, encontraron que las azoreductasas fueron inmunológicamente homólogas; además, la comparación de azoreductasas y nitrorreductasas indicó, que tienen idéntica movilidad electroforética en geles de poliacrilamina y se observó que los compuestos nitroaromáticos inhibían competitivamente la actividad azoreductasa; finalmente, se concluyó que ambas actividades eran realizadas por la misma enzima, una flavina adenina dinucleótido deshidrogenasa (Raffi y Cerniglia, 1995).

Tal como se mencionó en el marco teórico, existen muchos reportes de reductasas capaces de reducir colorantes azo y compuestos nitroaromáticos, luego entonces, se podría suponer que dichas enzimas son inespecíficas hacia el sustrato que reducen. Siendo así, hay una gran posibilidad de que los tres grupos bacterianos presentes en el lodo (glucolíticas, sulfatorreductoras y metanogénicas) produzcan azoreductasas, ya que Gorontzy y col. (1993) observaron que *Desulfovibrio gigas*, *Methanosarcina frisia* y *Clostridium* spp. son capaces de reducir compuestos nitroaromáticos; la reducción realizada por el género *Clostridium* y las bacterias sulfatorreductoras estuvieron relacionadas al crecimiento bacteriano y, en el caso de *Desulfovibrio gigas*, la reducción dependió del tipo de donador de electrones; por otra parte, la cepa metanogénica era "lisada" en presencia de los compuestos nitroaromáticos pero, a pesar de esto, tal suspensión formada de células y extractos celulares fue capaz de reducir compuestos nitroaromáticos.

Con base en lo anterior, se realizó un experimento con el objetivo de verificar si alguno de los grupos bacterianos sulfatorreductor, metanogénico acetoclástico y glucolítico, contenidos en el lodo granular anaerobio aclimatado al colorante azo marino terasil, producían una azoreductasa extracelular en presencia del colorante en el medio de cultivo.

7.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y métodos usados para el aislamiento de los grupos bacterianos y pruebas con el colorante marino terasil se describen a continuación.

Sustancias orgánicas

Se utilizó el inhibidor específico de la actividad metanógena 2-bromoetanosulfonato, que fue comercializado por Sigma Co.

Material biológico

El material biológico usado fue el lodo granular anaerobio aclimatado al marino terasil en un reactor tipo EGSB sulfatorreductor, pero macerado.

Medios de cultivo

Los medios de cultivo usados fueron los mismos que se manejaron para la técnica del número más probable (ver Anexos II y III), pero modificado en la inoculación y adición de 50 mM de BES a los medios destinados a las bacterias glucolíticas y sulfatorreductoras.

Procedimiento para el aislamiento de los grupos bacterianos

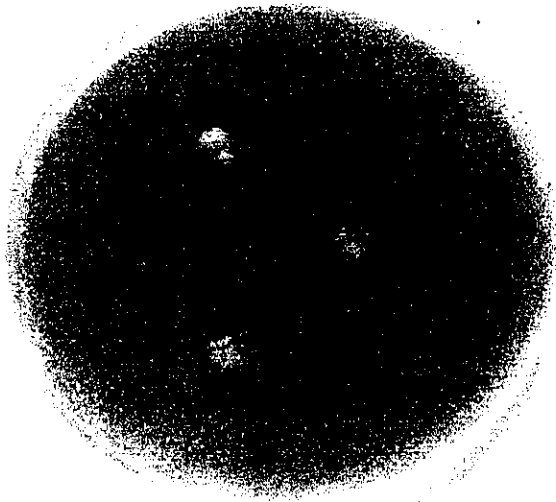
El aislamiento de los grupos bacterianos sulfatorreductor, metanogénico acetoclástico y glucolítico, se realizó mediante la técnica del número más probable, pero inoculando 1 mL de lodo aclimatado macerado en botellas serológicas de 120 mL conteniendo 50 mL del respectivo medio de cultivo líquido. Después de observar el crecimiento bacteriano, se realizó una segunda resiembra bajo las mismas condiciones; finalmente, después de observar el crecimiento y la composición de gases en la atmósfera de las botellas, se inoculó cada grupo bacteriano en el medio selectivo respectivo pero sólido, conteniendo al colorante azo marino terasil a una concentración de 70 mg/L. Adicionalmente, en los medios de cultivo para los grupos bacterianos fermentativo y sulfatorreductor, fue adicionado el inhibidor específico de la metanogénesis 2-bromoetanosulfonato (BES) a una concentración de 50 mM. La inoculación fue realizada en una cámara anóxica con atmósfera de nitrógeno y las cajas se colocaron en una cámara anaerobia portátil con una atmósfera $N_2:CO_2$ de 73%:27% a una temperatura de $34\pm 2^\circ C$.

7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

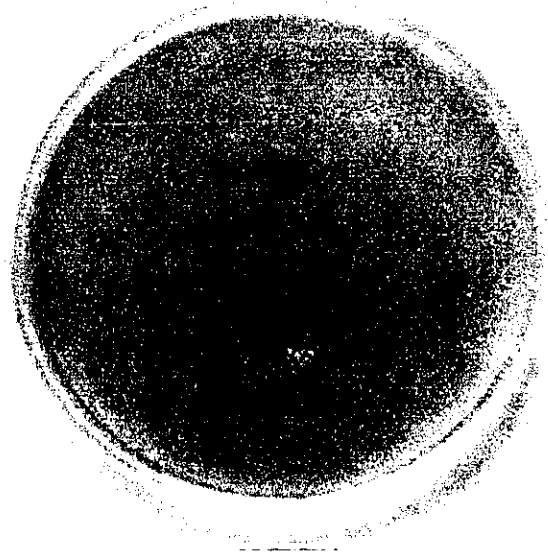
Para conocer al grupo bacteriano responsable de la posible actividad azorreductasa se aislaron los grupos sulfatorreductor, metanogénico y glucolítico en medio líquido; después de la segunda resiembra, se preparó la prueba en placa con los mismos medios, pero con la presencia del marino terasil. Los resultados de esta prueba se muestran en la Imagen 7.1, donde se observa que en ninguna de ellas hubo halo de decoloración, es decir, no se evidenció alguna actividad azorreductasa extracelular. Este hecho puede sugerir tres posibilidades. La primera es que no fueron aisladas las especies responsables de la decoloración; la segunda se refiere a que algún componente del medio no permitió que se presentara u observara la actividad y, por último, la tercera indicaría que quizás dicha actividad es intracelular. En relación con esta última posibilidad, existen reportes de reducción de colorantes azo por extractos celulares de *Aeromonas hydrophila* var. 24B y *Pseudomonas stutzeri* (Yatome y col., 1987; 1990). En el caso de *Aeromonas hydrophila* var. 24B, se comprobó la existencia de azorreductasas mediante electroforesis en geles de poliacrilamina. Resulta interesante indicar que las *Pseudomonas* son uno de los grupos glucolíticos que suelen encontrarse en los procesos de digestión; además, este género bacteriano tiene la capacidad de degradar más de 80

fuentes de carbono diferentes, por lo que sería probable su participación en la degradación parcial del marino terasil.

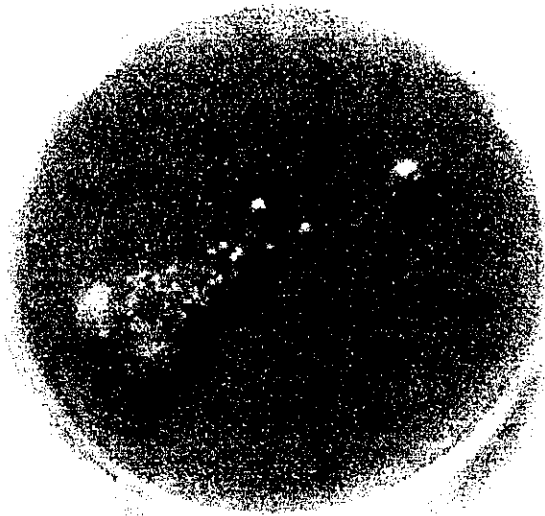
(A)



(B)



(C)



(D)

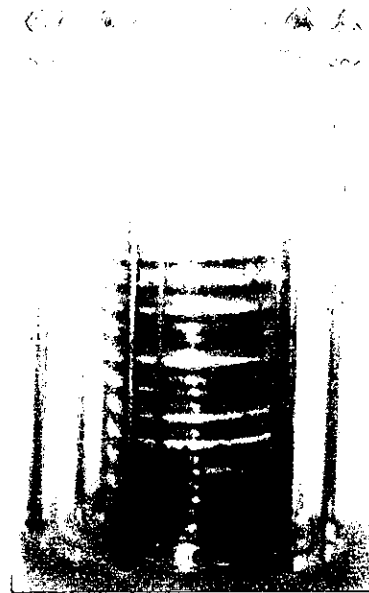


IMAGEN 7.1. Vistas del crecimiento en placa de cada grupo bacteriano. (A) colonias de bacterias sulfatorreductoras; (B) colonias de bacterias metanogénicas acetoclásticas; (C) colonias de bacterias glucolíticas; después de 21 días de cultivo en medio sólido conteniendo el colorante azo marino terasil a una concentración de 50 mg/L. (D) cámara anaerobia portátil utilizada para incubar las placas

CAPÍTULO 8. Discusión general

La aclimatación del lodo granular anaerobio al colorante en un reactor tipo EGSB sulfatorreductor alimentado con agua residual sintética que contenía 20 mg/L del colorante azo y glucosa (926 mg/L=930 mg DQO₅/L) como cosustrato se realizó en 28 días con una completa mineralización del azocompuesto. Sin embargo, las pruebas intermitentes ("batch") realizadas bajo la misma relación DQO/SO₄²⁻ (10:1) y con el lodo aclimatado, mostraron que sólo el 50% de las aminas aromáticas generadas durante la decoloración fueron mineralizadas, lo que podría indicar que únicamente un tipo de las dos aminas aromáticas generadas no fue degradado o que el sistema sólo podía degradar alrededor de 25 mg/L de dichas aminas, ya que en estas pruebas se utilizaron 50 mg/L del colorante, mientras que en la aclimatación se usaron 20 mg/L del mismo. En relación a lo anterior, ha sido reportada la mineralización de sólo una de las aminas aromáticas resultantes de la decoloración del anaranjado mordente 1 usando un reactor tipo UASB metanogénico y glucosa como cosustrato a concentraciones de 3 mg/L y 1.3 g DQO₅/L, respectivamente (Razo-Flores, 1997).

Por otra parte, la asimilación de la glucosa se realizó durante los primeros 21 días de las pruebas intermitentes y coincidió con la aparición en el medio de ácidos grasos volátiles (AGV), específicamente ácidos acético y propiónico, que fueron totalmente asimilados hasta la tercera semana. Esta asimilación fue dependiente del valor del pH para el caso del acetato y, siendo el valor del pH en el medio entre 7.63 y 7.41, las bacterias metanógenas acetotróficas (BMA) contenidas en el lodo pudieron competir con las bacterias sulfatorreductoras acetotróficas (BSA), principalmente después de la disminución del sulfato en el medio, que se observó después de la primera semana. Respecto a la competencia por propionato, ésta depende de la relación DQO/SO₄²⁻ y, siendo la relación DQO/SO₄²⁻ ≈ 10, la degradación de propionato fue realizada por bacterias acetógenas (OHPA-P) acoplada a la utilización de H₂ por las bacterias sulfatorreductoras. Es importante mencionar que quizás no se detectó butirato en el medio porque éste fue degradado durante la primera semana, ya que los oxidadores sintróficos de butirato pueden competir con las bacterias sulfatorreductoras sin importar la concentración de sulfato en el medio (Visser, 1995; Celis, 2000).

Adicionalmente, al analizar las cinéticas del nitrógeno amoniacal y el carbono orgánico total (COT) en las pruebas intermitentes, se observó una posible relación entre las asimilaciones de carbono y nitrógeno, ya que ambas fuentes tuvieron una cinética similar durante la primera semana, pero cuando disminuyó el COT, representado principalmente por la glucosa, el amonio ya no fue asimilado. Este fenómeno podría interpretarse como un control de la asimilación de nitrógeno mediado por las proteínas del sistema de la fosfotransferasa, que regula la asimilación de carbono y nitrógeno en bacterias mediante la proteína denominada PII, esta proteína estaría regulando la expresión genética de la glutamina sintasa (GS), mediante la modulación de la actividad cinasa/fosfatasa de la proteína conocida como NRII o NTRB, que incidiría sobre la transcripción del gen *glnA*; adicionalmente, PII regularía la actividad de GS mediante su interacción con la adeniltransferasa, responsable de la adenilación de la GS, que conduciría a su inactivación (Charbit, 1996). Obviamente, no se podría considerar que todas las especies contenidas en el lodo tuvieran este sistema; sin embargo, si se considera que el grupo glucolítico comprende el 95% del lodo, cabe la posibilidad de que varios géneros o uno sólo de ellos, pero abundante, presente dicho sistema de regulación, ya que las bacterias anaerobias que fermentan la glucosa utilizan el sistema de la fosfotransferasa para su transporte.

Durante las pruebas intermitentes para estudiar el efecto del cosustrato (glucosa), se observó que la decoloración biótica del marino terasil fue realizada en presencia y ausencia de glucosa contenida en el medio, esto indicó que para las concentraciones de colorante azo utilizadas, el lodo tiene suficiente poder reductor para reducir hasta 160 mg/L de colorante, ya que los tratamientos sin glucosa con 100 y 200 mg/L del colorante obtuvieron porcentajes de decoloración mayores al 80%; aunque no se sabe cuánto colorante podría seguir decolorando el lodo sin tener una fuente de carbono fácil de asimilar como la glucosa, es decir, un eficiente donador de electrones para todo el consorcio bacteriano, que genere poder reductor. En caso de que se agotara el poder reductor y la asimilación de glucosa aportara los equivalentes reductores, entonces podría pensarse en un fenómeno de cometabolismo, donde la asimilación de glucosa y generación de poder reductor ocasionarían la reducción del enlace azo, ya que el colorante actuaría como aceptor de electrones; posteriormente, las aminas aromáticas generadas serían asimiladas al romperse el anillo aromático por acción del potencial enzimático de los microorganismos contenidos en el lodo.

Por otra parte, se observó una disminución de más de 50% en el consumo de la glucosa en los tratamientos intermitentes con 100 y 200 mg/L del colorante y, dado que las bacterias glucolíticas son las principales responsables de dicho consumo, se interpretó este fenómeno como un efecto tóxico del colorante sobre dichas bacterias. Dicho efecto tóxico repercutiría en los grupos bacterianos dependientes del metabolismo glucolítico como las bacterias sulfatorreductoras, las cuales mostraron un retraso en la producción de ácido sulfhídrico; aunque existe la posibilidad de que también estas bacterias fuesen afectadas por el azocompuesto. Otro evento, que confirmó el efecto tóxico del colorante fue el descenso del pH detectado en el tratamiento con 200 mg/L, dicho descenso quizás de debió a la acumulación de ácidos grasos volátiles (AGV), resultado de un efecto tóxico sobre las bacterias metanogénicas acetotróficas y sulfatorreductoras acetotróficas, principalmente; sin embargo, la diferencia en el porcentaje de metano producido fue poco significativa en los tratamientos con 50, 100 y 200 mg/L de colorante (32.78, 30 y 29.54%, respectivamente), por lo que el efecto tóxico del colorante quizás repercutió sobre las bacterias sulfatorreductoras acetotróficas.

La prueba realizada para identificar una actividad azorreductora extracelular mostró la ausencia de halos de decoloración, es decir, no se identificó ninguna actividad. Aunque existe la posibilidad de que no fuesen aisladas las especies responsables de la decoloración, también se puede argumentar que la actividad es intracelular, lo que podría estar respaldado por el hecho de que a concentraciones de 100 y 200 mg/L del colorante hubiera una alta decoloración, ya que es más probable que el colorante sea introducido dentro de la célula donde sería reducido mediante el poder reductor disponible, a una situación contraria donde la célula tuviera que excretar las enzimas azorreductasas con un alto gasto energético. Sin embargo, han sido reportados ambos casos; Scheline y col. (1970) encontraron en extractos celulares de *Streptococcus faecalis* una actividad azorreductora, que fue relacionada con una flavoproteína; por otra parte, Raffi y col. (1990) reportaron que *Eubacterium* spp. (2 especies), *E. hadrum*, *Clostridium* sp., *C. clostridiiforme*, *C. paraputrificum*, *C. nexile*, *Butyrivibrio* sp. y *Bacteroides* sp. producían constitutivamente una enzima azorreductasa que era liberada al ambiente extracelular; estudios posteriores revelarían que los géneros *Clostridium* y *Eubacterium* producen constitutivamente una deshidrogenasa que puede reducir el enlace azo del colorante "azul directo 15" y el grupo nitro de compuestos nitroaromáticos (Raffi y Cerniglia, 1993; 1995). Considerando lo anterior, el alto porcentaje de bacterias fermentativas en el lodo y las observaciones al microscopio electrónico realizadas por Famá (1998) a un lodo granular de la misma fuente, en donde observó bacilos con espora terminal semejantes a *Clostridium*; se puede argumentar que la reducción del colorante azo "marino terasil" pudo realizarse intracelular y extracelularmente, siendo el grupo bacteriano glucolítico el posible productor de las azorreductasas.

CAPÍTULO 9. Conclusiones y recomendaciones

De acuerdo con los resultados expuestos y analizados en los capítulos 3 al 8 se concluye lo siguiente.

1. El colorante azo marino terasil (20 mg/L), usado como única fuente de nitrógeno, es biodegradable por el lodo granular anaerobio en un reactor tipo EGSB sulfatorreductor alimentado con agua residual sintética, que contenía una relación $DQO/SO_4^{2-} \approx 10$ y 926 mg de glucosa/L (930 mg DQO_5/L) como cosustrato. Se obtuvo en 28 días un porcentaje de decoloración superior al 85% y una remoción de la DQO_5 , representada por la glucosa, igual al 90%.
2. El sistema biológico es capaz de asimilar el grupo amino de las aminas aromáticas y mineralizar el compuesto aromático resultante, hasta metano y dióxido de carbono.
3. El hecho de que la aclimatación en el reactor tipo EGSB provocara la disminución de los SSV indicó que el lodo fue perdiendo su estructura granular, lo cual podría tener efectos negativos en sus relaciones simbióticas a largo plazo, por lo que las condiciones usadas durante la aclimatación no representan un modelo para un proceso sino que sólo sirvieron para determinar la biodegradabilidad del colorante azo "marino terasil".
4. En relación a la fuente donde se obtuvo el lodo granular anaerobio, en este trabajo se comprobó que un lodo degradador de desechos del lavado de la cebada (celulosa y almidón) tiene el potencial enzimático para reducir el enlace azo del colorante.
5. Al ajustar las condiciones intermitentes sulfatorreductoras, a una concentración de 50 mg/L de marino terasil y 280 mg/L de cloruro de amonio, se obtuvo un porcentaje de decoloración del 85% y a la remoción de la DQO del 80%. Sin embargo, la biodegradación de las aminas aromáticas fue incompleta, ya que se detectaron cantidades equivalentes al 50% de las aminas aromáticas generadas durante la decoloración, lo que podría indicar que una de las aminas aromáticas separadas del compuesto no fue degradada o que el sistema sólo degrada alrededor de 20 mg/L del colorante.
6. La decoloración del marino terasil durante las pruebas intermitentes se realizó tanto en ausencia como en presencia de glucosa, concluyéndose que el carbohidrato no participó directamente sobre la decoloración, aunque puede considerarse que podría estar actuando como un donador de electrones para el sistema.
7. En condiciones intermitentes con presencia de glucosa el lodo granular anaerobio fue capaz de tolerar hasta 200 mg/L del colorante con porcentajes de decoloración superiores al 80%. Sin embargo, se observó un efecto negativo sobre el consumo de glucosa, que fue interpretado como un efecto tóxico del azocompuesto sobre las bacterias glucolíticas.
8. Respecto de la elucidación del grupo bacteriano involucrado responsable de la actividad azorreductasa, se concluyó que las especies aisladas no presentaron ninguna actividad azorreductora.

9. El modelo experimental desarrollado y utilizado durante este trabajo de investigación, se considera apropiado para determinar la biodegradabilidad de colorantes azo en un período corto de tiempo (seis meses), siempre y cuando el sistema biológico sea un lodo granular anaerobio sin importar su procedencia, aunque se sugiere hacer un análisis sobre los posibles intermediarios que se generarían al degradar el colorante azo en estudio y los compuestos que estuviera degradando el lodo que sería utilizado para las pruebas.
10. En futuras experiencias, sería apropiado realizar pruebas adicionales a las manejadas en este trabajo como la identificación de las especies bacterianas mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa.
11. La posibilidad de usar este lodo para un proceso industrial radica en el desarrollo de un proceso anaerobio que mantenga la estructura granular del lodo y promueva el rompimiento del enlace azo. Adicionalmente, sería necesario un proceso aerobio que asegure la biodegradación de las aminas aromáticas que no fuesen degradadas por el proceso anaerobio.

ANEXO I. DISEÑOS EXPERIMENTALES

I.I. Diseño experimental del Capítulo 3

Estabilidad

Para conocer la estabilidad del colorante ante las condiciones de esterilización, temperatura, agitación, pH y medios de cultivo; que se presentarían en las pruebas intermitentes ("batch"), se realizó para cada factor una prueba por triplicado en botellas serológicas de 160 mL con 50 mL de medio de cultivo y 50 mg/L de colorante marino terasil. Las condiciones específicas para cada prueba se indican en la siguiente estrategia.

Estrategia

- Estabilidad ante la esterilización

El colorante azo marino terasil fue inyectado al medio de cultivo para ser esterilizado bajo las condiciones que serían empleadas en las pruebas intermitentes (20 min a una presión de 15 lb/pulg² ó 103 kPa).

- Estabilidad ante la temperatura de incubación (37°C) y de almacenaje (4°C)

Se comprobó la estabilidad del colorante ante la temperatura de incubación, inyectando el colorante en el medio de cultivo e incubando un grupo de botellas a 37°C y otro a una baja temperatura (4°C).

- Estabilidad ante la agitación

Para esta prueba se inyectó el colorante en las botellas y se incubaron a 37°C con una agitación de 200 rpm.

- Estabilidad ante la acidez y la alcalinidad

Esta prueba se realizó con una solución, que contenía el colorante marino terasil y se le fue agregando lentamente ácido clorhídrico o hidróxido de sodio mientras se medía el pH en un potenciómetro; para cada caso se realizaron 3 cuantificaciones de la decoloración que hubo por acidez o alcalinidad.

La variable de respuesta fue la decoloración y la duración de las pruebas fue de 30 días o en algunos casos sólo duraron minutos.

I.II. Diseño experimental del Capítulo 4

Adsorción del colorante marino terasil por el lodo y efecto del agua residual sintética, ARS

Está ampliamente establecido que los lodos granulares adsorben colorantes con diferentes grados de adsorción, por lo que se diseñó un experimento para conocer el efecto del agua residual sintética (ARS) para alimentar el reactor tipo EGSB sobre la decoloración del marino terasil, aplicando la técnica desarrollada por Hitz y colaboradores (1978), pero modificada tal como se indica en la siguiente estrategia.

Estrategia

Para este experimento se usó la técnica desarrollada por Hitz y colaboradores, pero modificada en cuanto a la agitación, la cual fue de 100 rpm durante 30 minutos. El medio que se utilizó fue el ARS con un pH final de 7.13, y el inóculo fue lodo granular anaerobio intacto y lodo granular anaerobio sometido a esterilización por autoclave durante 20 min a una presión de 15 lb/pulg². Los tratamientos fueron por triplicado y se definieron basándose en sus variables como se presenta a continuación.

Tratamientos

- 1) Colorante y ARS
- 2) Colorante, ARS y lodo intacto
- 3) Colorante, ARS y lodo esterilizado

La variable de respuesta fue la decoloración y la prueba estadística aplicada fue la *t* de "student".

Aclimatación del lodo en un reactor tipo EGSB

Debido a que los colorante azo son compuestos xenobióticos y tóxicos para los microorganismos, éstos deben ser aclimatados a la presencia de dichas sustancias, por lo que se decidió usar un reactor tipo EGSB para la aclimatación del lodo granular anaerobio.

Estrategia

Para la aclimatación se implementó un reactor EGSB con un volumen líquido de 2.2 L y fue inoculado con 750 mL de lodo granular anaerobio (46.36 g de SSV/L) lavado y tamizado con una malla de 0.4 mm. El reactor fue alimentado con un agua residual sintética (ARS) con el colorante azo como única fuente de nitrógeno.

Las variables de respuesta fueron las producciones de metano y ácido sulfhídrico, decoloración, consumo de glucosa, sulfato residual y aminas aromáticas.

I.III. Diseño experimental del Capítulo 5

Está bien establecido que las aminas aromáticas pueden ser mineralizadas en condiciones anaerobias, por lo que se realizará una prueba con el protocolo establecido por Donlon y col. (1996), para la mineralización de colorantes azo.

Estrategia

Las pruebas de biodegradabilidad en forma intermitente ("batch") se realizaron con lodo aclimatado en el reactor tipo EGSB y las condiciones de cultivo fueron las siguientes:

- Micro-reactores intermitentes o botellas serológicas (120 mL) con 70 mL de medio de cultivo
- Colorante azo (50 mg/L)
- Glucosa como cosustrato (926 mg/L), equivalente a 930 mg DQO_S/L
- Sulfato de sodio (relación DQO/SO₄ = 10)
- Amortiguador del sistema: Fosfato dibásico de potasio
- Atmósfera anaerobia (N₂: CO₂)
- Temperatura de 34°C±1

Las variables de respuesta fueron la producción de aminas aromáticas, decoloración, glucosa residual, carbono orgánico total, pH, alcalinidad, DQO, absorbancia del anillo aromático y producciones de ácido sulfhídrico y metano. La duración del experimento fue de 56 días.

I.IV. Diseño experimental del Capítulo 6

Para conocer el efecto de la glucosa como cosustrato se prepararon pruebas intermitentes en botellas serológicas con 50 mg/L de marino terasil en presencia y ausencia del cosustrato; además, se adicionaron 2 tratamientos con 100 y 200 mg/L del azocompuesto, para observar la tolerancia del lodo hacia el colorante. Los detalles de la estrategia se mencionan a continuación.

Estrategia

Se realizaron pruebas de biodegradabilidad en forma intermitente ("batch") con el lodo aclimatado en el reactor tipo EGSB en condiciones sulfato-reductoras, utilizando glucosa como cosustrato y el medio reportado por Donlon y col. (1996).

Las condiciones de cultivo fueron las siguientes:

- Micro-reactores intermitentes o botellas serológicas (120 mL) con 70 mL de medio de cultivo
- Colorante azo (50 mg/L)
- Glucosa como cosustrato (926 mg/L), equivalente a 930 mg DQO_S/L
- Sulfato de sodio (relación DQO/SO₄ = 10)
- Amortiguador del sistema: Fosfato dibásico de potasio
- Atmósfera anaerobia (N₂: CO₂)
- Temperatura de 34°C±1

Cada tratamiento se define con base en sus variables, de la siguiente manera:

- 1) 50 mg/L del colorante con cosustrato y lodo esterilizado (control abiótico)
- 2) 50 mg/L del colorante con cosustrato
- 3) 50 mg/L del colorante sin cosustrato
- 4) 100 mg/L del colorante con cosustrato
- 5) 200 mg/L del colorante con cosustrato

Las variables de respuesta fueron la decoloración, glucosa residual, producción de sulfuro, pH y la producción de ácido sulfhídrico y metano. La duración del experimento fue de 28 días.

I.V. Diseño experimental del Capítulo 7

La estrategia para averiguar, tanto la existencia de una enzima azoreductasa extracelular como el grupo bacteriano que la secretaba, incluyó la separación de los grupos bacterianos mediante la técnica del número más probable y resiembra en los mismos medios selectivos pero con la adición del colorante azo marino terasil, siendo la variable de respuesta la aparición de halos de decoloración producidos por la actividad azoreductasa extracelular observada en algún grupo bacteriano. A continuación se detalla esta estrategia.

Estrategia

Para conocer que grupo bacteriano es el responsable de la degradación parcial o decoloración del azocompuesto marino terasil, se realizó el aislamiento de los grupos bacterianos sulfatoreductor, metanogénico acetoclástico y fermentativo mediante la técnica del número más probable usando el lodo aclimatado a dicho colorante en el reactor EGSB y botellas serológicas (120 mL) con 50 mL de medio de cultivo líquido. Después de observar el crecimiento bacteriano, se sembraron los grupos aislados bajo las mismas condiciones, para finalmente inocularlos en el medio selectivo respectivo sólido, pero con el colorante azo marino terasil a una concentración de 70 mg/L. En los medios de cultivo para los grupos bacterianos fermentativo y sulfatoreductor fue adicionado el inhibidor específico de la metanogénesis 2-bromoetanosulfonato (BES) a una concentración de 50 mM.

Cada tratamiento se define en base a sus variables de la siguiente manera:

- 1) Medio de cultivo sin bacterias (control de estabilidad del colorante)
- 2) Medio de cultivo con bacterias fermentativas aisladas
- 3) Medio de cultivo con bacterias sulfatoreductoras aisladas
- 4) Medio de cultivo con bacterias metanogénicas aisladas

El agar se añadió durante la reducción de los medios de cultivo, las cajas se llenarán en presencia de mecheros, antes de vaciar el medio en las cajas petri se añadieron 6 mL de la solución stock de colorante azo, para obtener una concentración final de 50 mg/L en el medio sólido. En todos los casos, las cajas fueron colocadas en una cámara anaerobia portátil a la que se le hizo un cambio de atmósferas durante 20 min con una mezcla de $N_2:CO_2$ v/v y se incubó a $35 \pm ^\circ C$. La variable de respuesta fue la presencia de halos que indicarán la decoloración.

ANEXO II. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO E INOCULACIÓN PARA LAS PRUEBAS INTERMITENTES ("BATCH")

II.I. Preparación de medios anaerobios

De manera general, las bacterias presentes en el lodo anaerobio requieren condiciones altamente reductoras. Algunas bacterias anaerobias, como las metanógenas no pueden desarrollarse en medios con potenciales de óxido-reducción superiores a -0.33 V (Hungate, 1969), por lo que es difícil obtener las condiciones adecuadas de cultivo para estos

microorganismos. Es necesario tener un indicador confiable que permita saber cuándo un medio ya está reducido. La resazurina ha mostrado ser muy eficiente, ya que permite detectar potenciales de reducción por arriba -0.042 V (Hungate, 1969).

En primer lugar, debe evitarse la exposición ante oxígeno durante la preparación del medio y se recomienda adicionar un agente reductor como paso final. Debido a que el aire es la fuente principal de oxígeno, debe excluirse de los medios de cultivo. Esto se logra por desplazamiento de la fase gaseosa con un gas libre de oxígeno (cambio de atmósferas), como el dióxido de carbono, hidrógeno, nitrógeno o una mezcla de estos gases. Los cultivos no requieren de incubadoras especiales y pueden manejarse al aire libre siempre y cuando los contenedores (tubos de Hungate y botellas serológicas) estén perfectamente cerrados (Hungate, 1969).

Procedimiento para reducir el medio de cultivo

- 1) A 800 mL de agua destilada se le añadieron las sales, la glucosa, el sulfato de sodio, la resazurina y los elementos traza para un litro de medio de cultivo, se agitó muy suavemente la solución con una barra magnética hasta disolver todos los compuestos y se aforó a un litro. Después, el litro de medio de cultivo se repartió en 2 matraces Erlenmeyer de 1 L, marcando con un plumón el nivel que indicaban los 500 mL añadidos a cada matraz.
- 2) A cada matraz con 500 mL de medio de cultivo, se le añadieron 200 mL de agua y una manguera de latex con una punta de plástico ("tip" para pipetas), la cual estaba sujeta mediante papel aluminio, que tapaba la boca del matraz y permitía el paso de la manguera para que se conectara a un tanque de nitrógeno. Cada matraz con el dispositivo mencionado se calentó en una parrilla eléctrica.
- 3) En el momento en que el medio de cultivo empezó a hervir se abrió lentamente la llave de paso del tanque de nitrógeno hasta obtener una corriente de N_2 que produjera un burbujeo que no expulsara el medio fuera del matraz.
- 4) Cuando quedaban 50 mL del exceso de agua añadido, es decir 550 mL del medio de cultivo en cada matraz, se retiraron los matraces de las parrillas y se dejaron enfriar manteniendo la corriente de N_2 con la punta de la manguera sumergida aproximadamente 2 cm en el medio de cultivo en todo momento del proceso. Al enfriarse los matraces, se les agregó la cisteína y se taparon con un tapón de hule sellado con parafilm para ser llevado a la cámara anaerobia y repartir el medio en las botellas serológicas o tubos de ensayo para la técnica del NMP.
- 5) En el caso de las botellas serológicas, éstas fueron llenadas con 70 mL de medio de cultivo y tapadas con tapones de goma dentro de la cámara con atmósfera inerte. Las botellas fueron sacadas de la cámara y se les colocaron sellos de aluminio. Posteriormente se realizó el cambio de atmósferas durante 5 min con una mezcla de gases N_2 95% - CO_2 5% (aproximadamente) para, finalmente, esterilizar las botellas por autoclave.

II.II. Inoculación del medio para las pruebas intermitentes ("batch")

Después de la esterilización, las botellas fueron inoculadas con 3.4 g de lodo granular anaerobio aclimatado. La cantidad de inóculo se basó en el siguiente cálculo:

Se determinaron los SSV del lodo aclimatado, dando como resultado 37.52 g SSV/L, mientras que 5 mL de lodo pesaron 4.55 g. Para determinar esto se midió en probeta un volumen de 5 mL de lodo (se hizo por triplicado).

$$\begin{array}{l} 4.55 \text{ g} \text{ --- } 5 \text{ mL} \\ x \text{ --- } 1000 \text{ mL} \end{array} \Rightarrow x = 909.3 \text{ g}$$

$$37.52 \text{ g SSV/L} = 909.3 \text{ g de lodo/L}$$

Dado que se requerían 2 g SSV/L para el inóculo:

$$\begin{array}{l} 2 \text{ g SSV} \text{ --- } 1000 \text{ mL} \\ x \text{ --- } 70 \text{ mL} \end{array} \Rightarrow x = 0.14 \text{ g SSV}$$

Entonces:

$$\begin{array}{l} \text{g de lodo} \text{ --- } 37.52 \text{ g SSV} \\ x \text{ --- } 0.14 \text{ g SSV} \end{array} \Rightarrow x = 3.4 \text{ g de lodo}$$

Por lo tanto:

Se deben agregar 3.4 g de lodo por cada 70 mL de medio de cultivo. Esta cantidad corresponde a 2 g SSV/L.

La inoculación se hizo en una balanza analítica rápidamente, ya que el medio empieza a oxidarse. Para esto, se pone la botella abierta en la balanza analítica y se tara, después se agrega la cantidad de lodo calculada, se pone de nuevo el tapón y el sello de aluminio y se vuelve a hacer el cambio de atmósferas, bajando la presión en la botella mediante una manguera de latex con punta de aguja conectada a la botella y el otro extremo sumergido en un recipiente con agua, la aguja se retiró hasta que el burbujeo dentro del agua desapareció.

Finalmente se inyectó el colorante azo marino terasil, con base en el siguiente cálculo:

► Se requiere una concentración de 50 mg/L en 70 mL de medio de cultivo.

- 3.5 mg de colorante puro (en polvo)/70 mL de medio = 0.05 mg/mL = 50 mg/L (66.5 mg DQO₅/L).
- Se pesaron 350 mg del colorante y se disolvieron en 100 mL de agua destilada para inyectar 1 mL de esta solución concentrada en cada botella con 70 mL de MB para obtener una concentración de 50 mg/L de marino terasil, a los tratamientos de 100 mg/L se les añadieron 2 mL de la solución concentrada del colorante.
- Las botellas fueron colocadas en una agitadora a 140 rpm dentro de un cuarto caliente a 33 ± 2° C.

- De cada tratamiento se eligieron botellas sin inocular como controles iniciales y los controles abióticos fueron inoculados con lodo esterilizado bajo las mismas condiciones usadas para el medio de cultivo.

ANEXO III. SOLUCIONES Y SUSTRATOS PARA LA TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE, NMP

En plantas de tratamiento anaerobias, los microorganismos se encuentran formando consorcios que de manera conjunta degradan la materia orgánica hasta metano y dióxido de carbono principalmente, y se produce ácido sulfhídrico cuando hay sulfatos en el agua a tratar. En dichos consorcios se distinguen seis grupos tróficos: Bacterias glucolíticas, bacterias acetoclásticas, bacterias acetógenas productoras obligadas de hidrógeno (OHPA, Obligated Hydrogen Producing Acetogen) bacterias hidrogenófilas y bacterias sulfatorreductoras. La técnica del "Número Más Probable" tiene el objetivo de estimar el número de bacterias de cada grupo bacteriano presente en un consorcio anaerobio. Las soluciones y sustratos que se requieren para esta técnica se presentan a continuación.

III.I. Soluciones

Las soluciones para los medios de cultivo anaerobios son preparadas en condiciones aerobias con el mínimo de agitación requerida para la disolución de los compuestos y se conservan en refrigeración a 4°C.

- Solución mineral 1 (Balch y col., 1979)

K_2HPO_4	6.0 g
------------	-------

Disolver completamente con agua destilada y aforar a 1000 mL.

- Solución mineral 2, con sulfatos (Balch y col., 1979)

KH_2PO_4	6.0 g
$(NH_4)_2SO_4$	6.0 g (45.4 mM)
NaCl	12.0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.6 g (10.55 mM)
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.16 g
$CaCl_2$ (cuando no hay el anterior)	0.12 g

Disolver todos los reactivos en agua destilada y aforar a 1000 mL.

- Solución mineral 2, con cloruros (Modificada de Balch y col., 1979)

KH_2PO_4	6.0 g
$(NH_4)Cl$	2.4 g
NaCl	12.0 g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	2.1 g

CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.16 g
CaCl ₂ (cuando no hay el anterior).	0.12 g

Disolver todos los reactivos en agua destilada y aforar a 1000 mL.

- Solución de vitaminas (Balch y col., 1979)

Biotina	2.0 mg
Ácido fólico	2.0 mg
Piridoxina HCL	10.0 mg
Tiamina HCL	5.0 mg
Riboflavina	5.0 mg
Ácido nicotínico	5.0 mg
D.L. pantotenato de calcio	5.0 mg
Vitamina B12	1.0 mg
Ácido p-aminobenzóico	5.0 mg
Ácido lipoico	5.0 mg

Disolver en agua destilada, se recomienda disolver uno por uno completamente, la solución normalmente tiene un color amarillo muy tenue. Aforar a 1000 mL y cubrir el frasco con papel aluminio.

- Solución de oligoelementos (Balch y col., 1979)

Ácido nitrilotriacético	1.5 g
-------------------------	-------

Disolverlo en aproximadamente 900 mL de agua destilada y ajustar cuidadosamente el pH a 6.5 con KOH antes de agregar los siguientes reactivos:

MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.0 g
MnSO ₄ ·2H ₂ O	0.5 g
NaCl	1.0 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g
CoSO ₄	0.1 g
CoCl ₂ (cuando no hay el anterior)	0.1 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1 g
ZnSO ₄	0.1 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.01 g
AlK(SO ₄) ₂	0.01 g
H ₃ BO ₃	0.01 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.01 g

Disolver todos los reactivos, ajustar muy cuidadosamente el pH a 7 y aforar a 1000 mL con agua destilada previamente neutralizada con KOH.

III.II. Medio para los diferentes grupos bacterianos

a) Medio para bacterias sulfatorreductoras

Solución mineral 1	100 mL
Solución mineral 2 con sulfatos	100 mL
Resazurina al 0.1%	1 mL
Extracto de levadura	1 g
FeSO ₄	0.5 g
Solución de ácido láctico neutralizado	8.5 mL
Cisteína	0.25 g
Agua destilada – cuanto baste para	1000 mL

b) Medio para bacterias glucolíticas o consumidoras de glucosa (fermentativas)

Solución mineral 1	50 mL
Solución mineral 2 con sulfatos	50 mL
Solución de oligoelementos	10 mL
Solución de vitaminas	10 mL
Resazurina al 0.1%	1 mL
Extracto de levadura	1 g
Peptona de caseína	1 g
Bicarbonato de sodio	3 g
Solución de FeSO ₄ · 7 H ₂ O (2%)	1 mL
Solución de NiCl ₂ (5 mg/100 mL)	10 mL
Cisteína	0.5 g
Agua destilada c. b. p.	1000 mL

c) Medio para bacterias metanogénicas acetoclásticas

Es el mismo medio que se describió para las bacterias glucolíticas, sólo que se adicionan 5 g/L de acetato de sodio antes de comenzar a reducir el medio de cultivo.

III.III. Sustratos

Los sustratos para la técnica del número más probable también son preparados en condiciones aerobias con el mínimo de agitación requerida para la disolución de los compuestos y se conservan en refrigeración a 4°C.

Procedimiento para hacer las soluciones de sustratos

1. Reducir un volumen adecuado de agua destilada, bajo corriente de nitrógeno en un matraz Erlenmeyer tal como se hace para reducir un medio de cultivo, se necesitan 9 mL por cada tubo de ácido orgánico y 10 mL para cada uno de glucosa. Además, se deben preparar los tubos para sustratos con los siguientes reactivos, por cada tubo etiquetado adicionar:

Ácido butírico.....	1 mL + 1 lenteja de NaOH
Ácido propiónico.....	1 mL + 1 lenteja de NaOH
Glucosa.....	2.5 g dextrosa anhidra

2. Tapar los tubos con tapones horadados y septos de hule, insertar dos agujas en cada septo para favorecer el cambio de atmósferas en el interior de cada tubo.
3. Colocar los tubos en una gradilla y meterlos a la precámara anaerobia.
4. El agua reducida, se enfría y se tapa la boca del matraz con un tapón de hule adecuado.
5. Meter el agua y un dosificador o pipeta serológica y propipeta a la precámara anaerobia.
6. Hacer el cambio de atmósferas en la precámara anaerobia y meter el material a la cámara anaerobia.
7. Destapar los tubos de Hungate y adicionar 9 mL de agua destilada reducida a cada tubo de ácido propiónico y ácido butírico y 10 mL a cada tubo de glucosa.
8. Tapar de nuevo los tubos con sus tapones y septos sin las agujas, sacarlos y esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 103 kPa (15 lb/pulg²).
9. Mantener en refrigeración, desecharlos cuando se enturbien.

Procedimiento para hacer la solución reductora

Esta solución se utiliza para reducir el medio al momento de inocular y esta hecha de Na₂S.

Sulfuro de sodio (Na₂S)..... aprox. 2.5 g/100 mL

Los pasos a seguir para hacer la solución reductora son los siguientes:

1. Reducir un volumen adecuado de agua destilada, bajo corriente de nitrógeno en un matraz Erlenmeyer de capacidad adecuada.
2. Por cada 100 mL de agua, adicionar 1 lenteja de NaOH.
3. Enfriar bajo corriente de nitrógeno.
4. Pesar 3 g de Na₂S, lavarlos con agua destilada y pesar, debe estar entre 2.3 y 2.5 g.
5. Disolver el Na₂S en el agua reducida y fría, retirar la corriente de nitrógeno y tapar la boca del matraz con un tapón de hule adecuado.
6. Meter a la cámara anaerobia la solución, repartir 10 mL en cada tubo, los tubos de Hungate deben estar bien limpios y etiquetados, se recomienda lavarlos con un poco de ácido clorhídrico para asegurar su limpieza.
7. Sacar el material y esterilizar los tubos en autoclave durante 20 minutos a 15 lb/pulg².
8. Mantener en refrigeración.
9. La solución debe ser incolora, desechar cuando se enturbie o exista coloración.

REFERENCIAS

- Adriaens, P. y W. J. Hickey. (1994). "Physiology of biodegradative microorganisms"; en: *Biotechnology for the treatment of hazardous wastes*. D. L. Stoner, Ed. Lewis Publishers, pp: 97-135. Londres, Inglaterra.
- Anliker, R., G. Dürig, D. Steinle y E. J. Moriconi. (1988). List of colorants to be classified as toxic. JSDC. Mayo/Junio:223-225.
- APHA-AWWA-WPFC. (1996). *Standard methods for examination of water and wastewater*. 18ava ed. American Public Health Asociation, p. 1268. Baltimore, EEUUA.
- Balch, W. E., G. E. Fox, L. J. Magrum, C. R. Woese y R. S. Wolfe. (1979). Methanogens: Reevaluation of unique biological group. Microbiol. Rev. 43:260-296.
- Bishop, P. (1996). "The biodegradation of textil dyes using biofilm treatment systems"; en: *Biodegradación de compuestos orgánicos industriales*. K. Ilangovan y R. Briones, Eds. Instituto de Ingeniería, UNAM, pp: 1-10. México, D. F. México.
- Boopathy, R. y C. F. Kulpa. (1992). Nitroaromatic compounds serve as nitrogen source for *Desulfovibrio* sp. (cepa B). Can. J. Microbiol. 39:430-433.
- Boopathy, R., C. F. Kulpa y M. Wilson. (1993). Metabolism of 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) by *Desulfovibrio* sp. (cepa B). Appl. Microbiol. Biotechnol. 39:270-275.
- Brown, J. (1981). Reduction of polymeric azo and nitro dyes by intestinal bacteria. Appl. Environm. Microbiol. 41:1283-1286.
- Cao, W., B. Mahadevan, D. L. Crawford y R. L. Crawford. (1993). Characterization of extracellular azo dye-oxidizing peroxidase from *Flavobacterium* sp. ATCC 39723. Enzyme Microbiol. Technol. 15:810-817.
- Chao, W. L. y S. L. Lee. (1994). Decoloration of azo dyes by three white-rot fungi: Influence of carbon source. World J. Microbiol. Biotechnol. 10:556-559.
- Celis, M. L. B. (2000). Efecto del sulfato en la biodegradación anaerobia de acetato. Tesis de Maestría en Ciencias (Bioquímicas). UNAM, Facultad de Química. México, D. F. México.
- Charbit, A. (1996). Coordination of carbon and nitrogen metabolism; en *Memorias 14th Forum in Microbiology*. pp. 513-518.
- Chung, K. T., G. E. Fulk y M. Egan. (1979). Reduction of azo dyes by intestinal anaerobes. Appl. Environm. Microbiol. 35 (3):558-562.
- Chung, K. T. y Cerniglia, C. E. (1992). Mutagenicity of azo dyes: Structure-Activity relationships. Mutation Research. 227:201-220.
- Chung, K. T., S. E. Stevens y C. E. Cerniglia. (1992). The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. Crit. Rev. Microbiol. 18 (3):175-190.
- Colour Index. (1971). *Society of dyes and colourists*, Bradford, Engl. and American Association of Textil Chemists and Colourists, pp: 4009-4379. Lowell, Mass. EEUUA.

- Donlon, B., E. Razo-Flores, J. Field y G. Lettinga. (1995). Toxicity of N-substituted aromatics to acetoclastic methanogenic activity in granular sludge. Appl. Environm. Biotechnol. 61 (11):3889-3893.
- Donlon, B., E. Razo-Flores, G. Lettinga y J. Field. (1996). Continuous detoxification, transformation, and degradation of nitrophenols in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. Biotechnol. Bioeng. 51:439-449.
- Donlon, B., E. Razo-Flores, M. Lujten, H. Swarts, G. Lettinga y J. Field. (1997). Detoxification and partial mineralization of the azo dye mordant orange 1 in a continuous upflow anaerobic sludge-blanket reactor. Appl. Environm. Biotechnol. 47: 83-90.
- Dubbin, P. y K. L. Wright. (1975). Reduction of azo food dyes in culture of *Proteus vulgaris*. Xenobiotica. 5:563-571.
- Dunnivant, F. M., R. P. Schwarzenbach y D. L. Macalady. (1992). Reduction of substituted nitrobenzenes in aqueous solutions containing natural organic matter. Environm. Sci. Technol. 26:2133-2141.
- Famá, G. (1998). Caracterización ultraestructural de granulos anaerobios de reactores UASB industriales operados en mesofilia. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa. México, D. F. México.
- Fang, H. P., H. K. Chui y Y. Y. Li. (1995). Microstructural analysis of UASB granules treating brewery wastewater. Wat. Sci. Technol. 31 (9):129-135.
- Fewson, C. A. (1988). Biodegradation of xenobiotic and other persistent compounds: The causes of recalcitrance. TIBTECH. 6:148-153.
- García, M. (1996). Decoloración de colorantes azo y trifenolmetano por *Phanerochaete chrysosporium* por fermentación en medio sólido. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa. México, D. F. México.
- Ghosh, D. K., K. Ghoshal, A. Mandal y J. Chaudhuri. (1989). Enzymatic reduction of some azodyes by *Shigella dysenteriae* (tipo 1). Med. Sci. Res. 17:183-184.
- Gibson, D. T. y V. Subramanian. (1984). "Microbial degradation of aromatic hydrocarbons"; en: Microbial degradation of organic compounds. D. T. Gibson, Ed. Marcel Dekker, Inc., pp. 181-253. Nueva York, EEUUA.
- Gingell, R. y R. Walker. (1971). Mechanism of azo reduction by *Streptococcus faecalis*. II. The role of soluble flavins. Xenobiotica. 1:231-239.
- Gorontzy, T., J. Küver y K. H. Blotevogel. (1993). Microbial transformation of nitroaromatic compounds under anaerobic conditions. J. Gen. Microbiol. 139:1331-1336.
- Gregory, P. y C. V. Stead. (1978). The degradation of water-soluble azo compounds by dilute sodium hypochlorite solution. JSDC. Septiembre:402-407.
- Guerrero, M. E., R. Briones y K. Ilangovan. (1997). Degradación del colorante azo marino terasil empleando un reactor anaerobio tipo UASB; en: Memorias, VII Nal. de Biotecnología y Bioingeniería y II Simposio Int. sobre Ing. de Bioprocesos. Zacatecas, México.
- Guiot, S. R., A. Pauss y J. W. Costerton. (1992). A structural model of the anaerobic granule consortium. Wat. Sci. Technol. 25 (7):1-10.

Haug, W., A. Schmidt, B. Nörtemann, D. C. Hempel, A. Slotz y H.-J Knackmuss. (1991). Mineralization of the sulphonated azo dye mordant yellow 3 by a 6-aminonaphthalene-2-sulfonate-degrading bacterial consortium. Appl. Environ. Microbiol. 57 (11):3144-3149.

He, Y. y P. Bishop. (1991). Effect of acid orange on nitrification process. J. Environm. Eng. 120 (1):108-121.

Hitz, H. R., W. Huber y R. H. Reed. (1978). The adsorption of dyes on activated sludge. JSDC. Febrero:71-76.

Horitsu, H., M. Takada, E. Idaka, M. Tomoyeda y T. Ogawa. (1977). Degradation of p-aminoazobenceno por *Bacillus subtilis*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 4:217-224.

<http://cwis.polyu.edu.hk/~itc/vrspilot.htm>.

<http://www.blla.org.uk/html/legislation/german-azo.shtml>

<http://www.kommanet.nl/demo/ne020996.html>.

<http://www.tdctrade.com/alert/eu9906.htm>

Hu, T. L. (1994). Decolorization of reactive azo dyes by transformation with *Pseudomonas luteola*. Bioresource Technology. 49:47-51.

Hungate, R. E. (1969). A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. Methods in Microbiology 3B:117-132.

Hutzinger, O. y W. Veerkamp. (1981). "Xenobiotic chemicals with pollution potential"; en: Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds. T. Leisinger, R. Hütter, A. M. Cook y J. Nüesch, Eds. Academic Press, pp. 3-45. Londres, Inglaterra.

Idaka, E., H. Horitsu y T. Ogawa. (1987). Some properties of azoreductase produced by *Pseudomonas cepacia*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 39:982-989.

Ilangovan, K. y R. Briones (1995). Decolourization of textile industry waste water using expanded granular sludge blanket reactor; en: Proc. 8 th International Conf. On Anaerobic Digestión, Vol. 3. pp: 424-427.

Ilangovan, K. (1996). "Impacto ambiental de la industria textil en México: Avances en la biodegradación anaerobia y precipitación de colorantes tipo azo"; en: Segundo minisimposio internacional sobre remoción de contaminantes de aguas y suelos. K. Ilangovan, C. Durán de Bazúa y R. Briones, Eds. Instituto de Ingeniería, UNAM, pp. 144-158. México, D. F. México.

Jawetz, E., J. L. Melnick y E. A. Adelberg. (1987). Microbiología médica. Doceava edición. Manual Moderno, 349 p. México, D. F. México.

Kulla, H. G., F. Klausener, U. Meyer, B. Lüdeke y T. Leisinger. (1983). Interference of aromatic sulfo groups in the microbial degradation of the azo dyes Orange I y Orange II. Arch. Microbiol. 135:1-7.

Kuo, W. G. (1992). Decolorizing dye wastewater with Fenton's reagent. 26(7):881-886.

Kuramoto, N. y T. Kitao. (1982). Contribution of singlet oxygen to the photofading of some dyes. JSDC. 98 (Oct.):334-340.

Leahy, M. C. y R. A. Brown. (1994). Modelling and mapping are critical, while air sparging and soil vapor extraction have become strong allies. Chem. Eng. Mayo:108-116.

- Lettinga, G., A. F. Van Valsen, S. W. Hobma, W. De Zeeuw y A. Klapwijk. (1980). Use of the upflow sludge blanket (USB) concept for biological wastewater treatment, specially for anaerobic treatment. Biotecnol. Bioeng. 22:699-734.
- Lowry, O. H., N. J. Rosenbrogh, A. L. Farr y R. J. Randall. (1951). Protein measurement with the Folin fenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.
- Morrison, R. T. y R. N. Boyd. (1987). Química Orgánica. Addison-Wesley Iberoamericana. Segunda edición, pp. 1375. México, D. F. México.
- Motschi, H. (1994). Assessment and management of environmental exposure to colorants, en: Environmental exposure: Colorants. pp.329-335.
- NOM-AA-45-1981.- Análisis de agua, determinación de color (escala platino-cobalto). Norma Oficial Mexicana. Diario Oficial de la Federación. México, D. F. México.
- NOM-CCA-014-ECOL/1993, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en descargas de aguas residuales provenientes de la industria textil. Norma Oficial Mexicana. Diario Oficial de la Federación. México, D. F. México.
- NOM-CCA-001-ECOL/1993, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de las centrales termoeléctricas convencionales. Norma Oficial Mexicana. Diario Oficial de la Federación. México, D. F. México.
- NOM-001-ECOL-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Norma Oficial Mexicana. Diario Oficial de la Federación. México, D. F. México.
- NOM-002-ECOL-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano y municipal. Norma Oficial Mexicana. Diario Oficial de la Federación. México, D. F. México.
- Noyola, A., G. Moreno, A. Espinoza, R. Briones y J. Ramos. (1993). Tratamiento anaerobio de aguas residuales. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. Vol. II. 301 pp. México, D. F. México.
- Oren, A., P. Gurevich y Y. Henis. (1991). Reduction of nitrosubstituted compounds by the halophilic anaerobic eubacteria *Haloanaerobium praevalens* and *Sporehalobacter marismortui*. Appl. Environ. Microbiol. Nov.:3367-3370.
- Pandiyan, T., M. A. Ríos-Enríquez, S. Bernes y C. Durán-de-Bazúa. (1999a). Coenzyme M studies with nickel (II) compounds: Synthesis, structure, spectra, and redox behaviors. Polyhedron. 18:3383-3390.
- Pandiyan, T., S. Bernes y C. Durán-de-Bazúa. (1999b). Dichloro [2,2'-(dithiahexamethylene)di-pyridine-N,N',S,S']nickel (II). Acta Cryst., C55:318-320.
- Pandiyan, T., M. A. Ríos-Enríquez, S. Bernes y C. Durán-de-Bazúa. (1998). Nickel (II) (bis(benzimidazole-2-ylmethyl)amine)chloride. Acta Cryst., C54:1171-1172.
- Paszczynski, A., M. B. Pasti-Grigsby, S. Goszczynsky, R. L. Crawford y D. L. Crawford. (1992). Mineralization of sulphonated azo dyes and sulphaniic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. Appl. Environ. Microbiol. 58 (11):3598-3604.
- Rafii, F., W. Franklin y C. E. Cerniglia. (1990). Azoreduction activity of anaerobic bacteria isolated from human intestinal microflora. Appl. Environ. Microbiol. 56 (7):2146-2151.

- Rafii, F., W. Franklin, R. H. Heflich y C. E. Cerniglia. (1991). Reduction of nitroaromatic compounds by anaerobic bacteria isolated from the human gastrointestinal tract. Appl. Environ. Microbiol. 57 (4):962-968.
- Rafii, F. y C. E. Cerniglia. (1993). Localization of the azoreductase of *Clostridium perfringens* by immuno-electron microscopy. Curr. Microbiol. 27:143-145.
- Rafii, F. y C. E. Cerniglia. (1995). Reduction of azo dyes and nitro aromatic compounds by bacterial enzymes from the human intestinal tract. Environ. Health Perspect. 103 (Suplemento 5):17-19.
- Razo-Flores E., G. Rodríguez-Rodríguez, R. Rivera-Ramírez, y M. P. Bremauntz. (1993). Algunos aspectos acerca del proceso de digestión anaerobia parte III: El Reactor UASB. Rev. Lat.-Amer. Microbiol. 35:469-475.
- Razo-Flores, E. (1997). Biotransformation and biodegradation of N-sitituted aromatics in methanogenic granular sludge. Tesis doctoral. Universidad Agrícola de Wageningen, 162 pp. Wageningen, Holanda.
- Reis, M. A., P. C. Lemos, J. S. Almeida y M. J. Carrondo. (1991). Evidence for the intrinsic toxicity of H₂S to sulphate-reducing bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36:145-147.
- Rodríguez-Rodríguez, G., R. Rivera-Ramírez, E. Razo-Flores y M. P. Bremauntz. (1993). Algunos aspectos acerca del proceso de digestión anaerobia parte II: Bioquímica de la metanogénesis. Rev. Lat.-Amer. Microbiol. 35:459-468.
- Roxon, J., A. Ryan y S. Wright. (1966). Reduction of tartrazine by a *Proteus* species isolated from rats. Food. Cosmet. Toxicol. 4:419-426.
- Ryan, A. J., J. J. Roxon y A. Sivayavirojana. (1968). Bacterial azo reduction: A metabolic reaction in mammals. Nature. 219:854-855.
- Scheline, R. R., R. T. Nygaard y B. Longberg. (1970). Enzymatic reduction of the azo dye, acid yellow by extracts of *Streptococcus faecalis* isolated from rat intestine. Food Cosmet. Toxicol. 8:55-58.
- Schnell, S. y B. Schink. (1991). Anaerobic aniline degradation via reductive deamination of 4-aminobenzoyl-CoA in *Desulfobacterium anilini*. Arch. Microbiol. 155:183-190.
- SEMARNAP. (1993). Gaceta ecológica. Número 23, Diciembre:1-69.
- SEMARNAP. (1994). Gaceta ecológica. Número 26, Enero:1-75.
- Seshadri, S., P. Bishop y A. M. Agha. (1994). Anaerobic/aerobic treatment of selected azo dyes in wastewater. Waste Management. 14 (2):127-137.
- Singleton, Y. (1994). Microbial metabolism of xenobiotics: Fundamental and applied research. J. Chem. Technol. Biotechnol. 59:9-23.
- Spain, C. (1995). Biodegradation of nitroaromatic compounds. Annu. Rev. Microbiol. 49:523-555.
- Visser A. (1995). The anaerobic treatment of sulphate containing wastewater. Tesis doctoral. Universidad Agrícola de Wageningen, 145 pp. Wageningen, Holanda.
- Walker, R. (1970). The metabolism of azo compounds: A review of the literature. Food Cosmet. Toxicol. 8:659-676.

Walker, R. y J. Ryan. (1971). Some molecular parameters influencing rate of reduction of azo compounds by intestinal microflora. Xenobiotica. 1 (4 y 5):483-486.

Walker, R., R. Gingell y D. F. Murrells. (1971). Mechanism of azo reduction by *Streptococcus faecalis*. I. Optimization of assay conditions. Xenobiotica. 1 (3):221-229.

Yatome, Ch., T. Ogawa, K. Daishuke y E. Idaka. (1981). Biodegradability of azo and triphenylmethane by *Pseudomonas pseudomellei* 13NA. JSDC. 97:166-169.

Yatome, Ch., T. Ogawa, K. Itoh, A. Sugiyama y E. Idaka. (1987). Degradation of azo dyes by cell free extract from *Aeromonas hydrophila* var. 24B. JSDC. 103:395-398.

Yatome, Ch., T. Ogawa, H. Hishida y T. Taguchi. (1990). Degradation of azo dyes by cell free extract from *Pseudomonas stutzeri*. JSDC. 106:280-283.

Young, L. Y. (1984). "Anaerobic degradation of aromatic hydrocarbons"; en: Microbial degradation of organic compounds. D. T. Gibson, Ed. Marcel Dekker, Inc., pp: 487-523. Nueva York, EEUUA.