



44
**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**"ARRANQUE DE UN REACTOR POR LOTES EN
FASE ANAEROBIA-AEROBIA PARA LA
MINERALIZACION DEL PARA-NITROFENOL"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERO QUIMICO

P R E S E N T A:

MARIO LUIS CHEW HERNANDEZ



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**



MEXICO, D. F.

2001

292576



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente: Prof. Landy Irene Ramírez Burgos.
Vocal: Prof. José Sabino Sámano Castillo.
Secretario: Prof. Germán Buitrón Méndez.
1er Suplente Prof. Baldomero Pérez Gabriel.
2o. Suplente Prof. Alfonso Durán Moreno.

Sitio donde se desarrolló el tema:

INSTITUTO DE INGENIERÍA. UNAM.
COORDINACIÓN DE BIOPROCESOS AMBIENTALES.
CIRCUITO EXTERIOR. CIUDAD UNIVERSITARIA.

Asesor del tema:

Dr. Germán Buitrón Méndez



Sustentante:

Mario Luis Chew Hernández



DEDICATORIAS:

A Dios.

A mis padre Mario Chew y mi madre Silvia Hernández por el apoyo incondicional, cariño, ayuda y comprensión que me han brindado toda la vida, con todo respeto y agradecimiento.

A mis hermanos Gerardo y José Manuel.

A mis amigos de la facultad de química de la generación 94 Sergio, Ignacio, Héctor, Hugo, Próspero, Víctor y Rafael.

Agradecimientos.

Al Doctor Germán Buitrón Méndez, por permitirme desarrollar esta tesis, por su profesionalismo, su guía, sus enseñanzas y su paciencia para conmigo.

Al Instituto de Ingeniería de la UNAM, por proporcionarme los medios para realizar el trabajo experimental que desembocó en este trabajo.

A mis profesores de la facultad de Química por sus enseñanzas y en especial al Maestro José Antonio Ortiz por su confianza.

A la facultad de Química de la UNAM. Por que lo que ahora soy no es sino por las enseñanzas que ahí recibí.

INDICE

RESUMEN	I
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3

CAPITULO I. Marco teórico

I.1 Procesos de tratamiento biológico de aguas residuales	4
I.1.1 Clasificación de los procesos biológicos para el tratamiento de aguas residuales	5
I.1.2 Procesos Batch de tratamiento de aguas residuales	
I.1.2.1 Descripción del ciclo de operación de los sistemas SBR de tratamiento biológico	5
I.1.2.2 Ventajas de los procesos SBR	8
I.2 Aplicación de procesos biológicos en la degradación de compuestos xenobióticos	9
I.2.1 Introducción	9
I.2.2 Degradación microbiana de compuestos aromáticos	10
I.2.2.1 Vías oxigenolíticas (aerobias) de ataque a anillos aromáticos	10
I.2.2.2 Vías de degradación reductiva (anaerobia) de compuestos aromáticos	13
I.2.2.3 Vías de degradación en ambientes anaerobios y aerobios alternantes	13
I.3 Biodegradación de compuestos nitroaromáticos	15
I.3.1 Introducción	15
I.3.2 Química del grupo nitro en compuestos aromáticos	16
I.3.3 Degradación anaerobia de compuestos nitroaromáticos	18
I.3.3.1 Reducción del grupo nitro sin mineralización del compuesto	18
I.3.3.2 Reducción con transformación ulterior del compuesto nitroaromático	19
I.3.4 Degradación aerobia de compuestos nitroaromáticos	
I.3.4.1 Remoción oxigenolítica de el grupo nitro de los compuestos nitroaromáticos	21
I.3.4.2 Degradación del compuesto nitroaromático por reducción inicial del grupo nitro	23
I.3.4.3 Remoción del grupo nitro mediante reducción inicial del anillo aromático	24
I.3.4.4 Degradación de nitroaromáticos vía reducción parcial y reacciones de remplazamiento	25
I.3.5 Degradación de nitroaromáticos por hongos	26
I.4 Importancia y estudios previos de la degradación del p-nitrofenol	27
I.4.1 Importancia industrial y usos del p-nitrofenol	27
I.4.2 Degradación del p-nitrofenol	28
I.4.2.1 Transformaciones en ambientes aerobios	28
I.4.2.2 Transformaciones en ambientes anaerobios	28

CAPITULO II. Metodología

II.1 Fundamento y plan de experimentación	29
II.1.1 Propuesta para la degradación del p-nitrofenol en ambientes anaerobio-aerobio alternados	29
II.1.2 Estrategias de experimentación	30
II.1.2.1 Experimentación en operación tipo fed-batch	30
II.1.2.2 Operación con tiempos de reacción fijos	31
II.1.2.3 Tiempos de reacción variables	32
II.2 Material y métodos	
II.2.1 Descripción del reactor utilizado	33
II.2.2 Métodos analíticos	34

CAPITULO III. Resultados

III.1 Operaciones a eficiencias constantes en modo de operación fed-batch	35
<i>Discusión de los resultados</i>	36
III.2 Operación con tiempos anaerobio-aerobio fijos	37
III.2.1 Evolución de la eficiencia global	37
III.2.2 Espectros de absorción en distintas etapas de la reacción	37
III.2.3 Seguimiento de la concentración de PNF en el tiempo	38
III.2.4 Valores de carbono orgánico total (TOC)	40
III.2.5 Valores del potencial de oxido-reducción (E) y oxígeno disuelto a lo largo de la reacción	41
III.2.6 Tiempo requerido para la aparición de aminas en condiciones anaerobias con el licor mezclado del reactor de tiempos fijos	42
III.2.6.1 Descripción del experimento	42
III.2.6.2 Resultados	42
<i>Discusión de los resultados</i>	43
III.3 Operación a eficiencias constantes en modo SBR	44
III.3.1 Evolución de las concentraciones de paranitrofenol y aminofenol en varios ciclos	44
III.3.2 Espectros de absorción uv.visible en varias etapas de un ciclo	45
III.3.3 Evolución de los tiempos totales de reacción	47
III.3.4 Evolución de las velocidades de reducción del PNF en la etapa anaerobia y de mineralización del PAF en la etapa aerobia	48
III.3.5 Determinación del carbono orgánico total (TOC)	49
III.3.6 Valores del potencial de óxido-reducción y de oxígeno disuelto	52
III.3.7 Comparación de la transformación del PAF con aire en presencia de bacterias y en ausencia de ellas	53
III.3.7.1 Descripción	53
III.3.7.2 Resultados	54
<i>Discusión de los resultados</i>	55
CAPITULO IV. Conclusiones	56
BIBLIOGRAFÍA	57

Resumen

En este trabajo se ha estudiado la degradación del para-nitrofenol en dos etapas: Primero anaerobia en la que se espera transformar el compuesto a para-aminofenol, y después aerobia en la que se busca que el para-aminofenol sea mineralizado, con este fin se utilizó un reactor biológico por lotes (SBR) de biomasa suspendida el cual fue operado en dos políticas distintas, en la primera de ellas se establecían tiempos de reacción fijos y se observaba la variación en las características finales del efluente, mientras en la segunda se esperaba el tiempo necesario para lograr una transformación determinada de la sustancia, antes de pasar a la siguiente fase de la operación.

Los resultados muestran que la operación de tiempos fijos, aunque logra mineralizar el paranitrofenol con rapidez (5.5 horas para una concentración inicial de 21 mg/L de para-nitrofenol), no lleva a cabo la transformación de este a aminofenol en la etapa anaerobia, de donde se concluye que este modo de operar termina por seleccionar bacterias que atacan al paranitrofenol por vías oxidativas (aerobia), sin usarlo como aceptor final de electrones cuando no hay oxígeno disponible.

Operando a tiempos variables se consigue la reducción inicial del compuesto en la etapa anaerobia, el compuesto reducido es luego consumido por las bacterias en la etapa aerobia como se demostró por mediciones de carbono orgánico total. Dichas mediciones mostraron una remoción superior al 90% del contenido orgánico inicial del agua. Los tiempos de anaerobiosis fueron de 48 horas y los de aerobiosis de 24 horas operando a temperatura ambiente, para una concentración inicial de 30 mg/L de paranitrofenol.

Introducción

Recientemente se ha investigado el potencial de las bacterias y otros microorganismos en la degradación de compuestos xenobióticos, es decir, compuestos que se han generado principalmente por la actividad humana y no se hallan comúnmente en la naturaleza.

Se ha demostrado que muchos compuestos aromáticos sustituidos pueden ser degradados por microorganismos, si estos tienen las condiciones adecuadas y se da tiempo para su aclimatación. Los compuestos fenólicos sustituidos son especialmente difíciles de degradar por medios biológicos, entre ellos se han investigado especialmente los compuestos clorados y los nitroaromáticos. Los primeros han sido degradados con éxito por medios aerobios puros; sin embargo la gran electronegatividad del grupo nitro de los segundos lo hace particularmente resistentes al ataque oxigenolítico que caracteriza las vías aerobias.

La electronegatividad del grupo nitro hace que sea bastante propenso a reducirse en medios anaerobios. Investigaciones hechas sobre la degradación anaerobia de los nitrofenoles y nitrotoluenos demuestra que estos son transformados a las correspondientes aminas mediante la conversión del grupo $-\text{NO}_2$ a $-\text{NH}_2$. Sin embargo, las aminas son generalmente tóxicas para las bacterias anaerobias.

Los aminofenoles formados contienen el grupo $-\text{NH}_2$ que tiene un par de electrones libres los cuales pueden entrar en resonancia con el anillo aromático aumentando la densidad electrónica y facilitando el ataque del compuesto por vía oxidativa (aerobia).

Manteniendo las condiciones anaerobias al inicio de la reacción se puede conseguir que el nitrofenol (aún en presencia de otros compuestos orgánicos de más fácil degradación), quede reducido a aminofenoles, los que, a pesar de ser más tóxicos y cancerígenos, se degradan más fácil en condiciones de aeración.

Se logró la remoción completa de la sustancia y se verificó que efectivamente se llevaron a cabo las dos etapas de la transformación.

El primer capítulo de este trabajo revisa el fundamento y las características de los reactores biológicos llamados SBR, así como los estudios sobre la biodegradación de los compuestos fenólicos y particularmente los nitroaromáticos. El segundo trata sobre el material, equipo y métodos de análisis que se utilizaron para cuantificar la eliminación y transformación de las sustancias. El tercero presenta los resultados obtenidos en dos modos de experimentación, el primero se fijó las etapas de aeración y no-aeración en un tiempo determinado, en otros se dejó cada etapa el tiempo necesario para completar cada transformación. En el cuarto capítulo de este trabajo se analizan los resultados de los experimentos, sobre los que se concluye en el capítulo quinto.

Objetivos

1.- Objetivo general

- Evaluar la factibilidad de la degradación del paranitrofenol mediante una etapa anaerobia seguida de una aerobia.

2.- Objetivos particulares

- Probar distintas estrategias de arranque de un reactor anaerobio-aerobio para degradar p-nitrofenol.
- Cuantificar la conversión a aminas del p-nitrofenol en etapas anaerobia.
- Verificar la aclimatación de los microorganismos a las condiciones cambiantes de oxígeno al utilizar al inicio un inoculo de planta de tratamiento aerobio.
- Comprobar la mineralización del paranitrofenol con mediciones de niveles de contenido orgánico al inicio y final de los ciclos.

Capítulo I. Marco teórico

I.1 Procesos de tratamiento biológicos de aguas residuales

I.1.1 Clasificación de los procesos biológicos para tratamiento de aguas residuales

Los procesos biológicos para tratar agua contaminada son aquellos en los cuales se busca que una población de microorganismos (principalmente bacterias) transformen las sustancias indeseables del agua, convirtiéndolas en sustancias inocuas como dióxido de carbono y agua, así como en material celular (bacterias nuevas).

Los procesos biológicos pueden ser clasificados según si la biomasa esta formando flóculos o bien está en forma de una película sobre algún soporte. Los primeros procesos se llaman de biomasa en suspensión y los segundos de película fija.

Otra clasificación de dichos procesos se hace dependiendo de la disponibilidad de oxígeno libre (O_2). En este caso se clasifican como aerobios y anaerobios. Los procesos aerobios son aquellos donde el oxígeno está en cantidad suficiente para que la principal ruta metabólica de los microorganismos sea la llamada respiración aerobia, donde al final de la ruta de transporte de electrones estos son entregados al oxígeno molecular.

Los procesos anaerobios son aquellos donde existe la ausencia de oxígeno molecular debiendo recurrir los microorganismos a vías alternativas de generación de energía (fermentaciones), o a aceptores de electrones distintos al oxígeno (por ejemplo nitratos y sulfatos). Se ha dado el nombre de anóxica a las condiciones anaerobias donde se dispone de oxígeno ligado (nitratos, sulfatos, etc.) para respirar. Esta condición es de gran importancia para los procesos biológicos de desnitrificación.

Una ultima clasificación se lleva a cabo al diferenciar entre procesos continuos y discontinuos o intermitentes. Los procesos continuos son aquellos donde se tiene una alimentación de agua a tratar y retiro de efluente de una forma continua y donde el cambio en las condiciones del reactor con respecto al tiempo es prácticamente nula (estado estacionario). A esta categoría pertenecen los procesos convencionales usados como lodos activados, filtro percolador, contactores biológicos rotatorios (biodiscos) y lagunas de estabilización entre otros.

Son procesos discontinuos o intermitentes aquellos donde la entrada y salida de agua del reactor no es continua. Estos procesos se conocen como de "llenado y vaciado" (fill&draw process), en los que se admite una cierta cantidad de agua a tratar, se detiene o difiere el flujo de alimentación, luego se deja dentro del reactor un cierto tiempo para que los microorganismos degraden el contaminante y luego se retira el efluente.

1.1.2 Procesos batch de tratamiento de aguas residuales

Los procesos SBR (sequential batch reactor), entran dentro de la clasificación de procesos biológicos discontinuos. Los más comunes son aquellos donde la biomasa está en suspensión, ya sea mediante la acción de un mezclador o de la aeración continua, pero también los hay de empaque u otro tipo de relleno que convierte estos reactores en reactores de película fija.

En su forma más básica un reactor SBR es un conjunto de tanques que opera en una forma de llenado y vaciado. Cada tanque SBR es llenado durante un periodo de tiempo y luego es operado como reactor batch. Luego del tratamiento el licor mezclado se deja sedimentar y el sobrenadante clarificado se saca del tanque.

El reactor SBR pertenece a la categoría de sistemas de lodos de estado no estacionario. Es un sistema donde se imponen variaciones en las velocidades de crecimiento y/o ambientes de oxígeno alternantes sobre el consorcio de organismos en una base regular o periódica.

1.1.2.1 Descripción del ciclo de operación de los sistemas SBR de tratamiento biológico (figura 1.1.1)

1.- LLENADO.- Es la etapa en la cual se introduce al reactor agua para ser tratada. Esta agua se agrega a la biomasa que ha quedado en el reactor del ciclo previo. Hay tres formas de realizar el llenado: El llenado estático, el llenado mezclado y el llenado aireado.

- Llenado estático: En esta etapa el influente simplemente se agrega a la biomasa, el contacto entre el agua nueva y la biomasa es mínimo, lo que hace que cuando se empiece a mezclar o airear, la concentración de sustrato sea máxima y por lo tanto la velocidad de consumo sea también máxima. El llenado estático redundará en un mínimo consumo de energía.

- **Llenado mezclado:** Esta etapa busca la desnitrificación o reducción a N_2 de nitritos o nitratos, consiste en agitar (sin agregar aire) y poner en contacto la biomasa con el nuevo sustrato, en esta etapa también se pueden lograr condiciones reductoras. Al inicio del llenado-mezclado, quizá halla algo de oxígeno disuelto todavía presente en el reactor, el efecto de poner en contacto la biomasa con el sustrato nuevo a través del mezclado, hace que debido a la alta concentración del sustrato el oxígeno que quedaba sea usado rápidamente. Se generan ahora condiciones donde las bacterias consumirán los oxígenos disponibles en los nitritos y nitratos y liberarán nitrógeno molecular N_2 . Cuando se acabe el oxígeno disponible como nitrito o nitrato se cambiará a un sistema anaerobio de degradación biológica.
- **Llenado aireado:** Aquí se mezcla y se adiciona aire al sistema mientras se agrega la carga de agua de desecho. Esta política de llenado da lugar al inicio de las reacciones aerobias con la consecuente reducción de los tiempos de ciclo y mantiene bajas las concentraciones de sustrato, lo que puede ser importante si existen componentes biodegradables que puedan ser tóxicos a concentraciones elevadas.

2.- ETAPA DE REACCIÓN: En esta etapa se detiene la entrada de agua contaminada y se inicia la aeración, la que puede durar todo el tiempo de reacción, o bien se alternan etapas de aeración con etapas de mezclado sin aeración dependiendo de los objetivos del proceso. Es esta la etapa donde deben de alcanzarse los objetivos de remoción de contaminantes para los que el reactor haya sido diseñado.

3.- ETAPA DE SEDIMENTACIÓN: Aquí se detiene tanto el mezclador como el aireador y se deja que los lodos se sedimenten por gravedad. Como la biomasa no se purga continuamente, no hay necesidad de plumas móviles que acumulen los lodos del fondo del sedimentador. La biomasa es periódicamente extraída dependiendo de la edad de lodos que se quiera usar. Esta etapa dura típicamente entre media hora y una hora y media.

4.-DECANTADO O EXTRACCIÓN: Se procede a retirar el sobrenadante tratado. Para ello puede utilizarse un mecanismo de mampara flotante que asegure que la extracción del efluente se realice unos centímetros debajo de la superficie del agua o bien pueden ser sistemas de localización fijas que se abran mediante una válvula. Esta fase dura de 5 a más

del 30% del total de tiempo del ciclo. Esto depende del tamaño del tanque así como la forma que se haga la extracción. Pueden seguirse las mismas recomendaciones sobre velocidad de ascenso del agua y de flujo por unidad de longitud de la mampara de salida que se utilizan en los sedimentadores secundarios de los procesos continuos para prevenir que el lodo sea "jalado" por la corriente de salida.

5.- TIEMPO MUERTO: Es el tiempo que el tanque espera desde que se ha terminado la extracción de líquido tratado hasta que se le agregue la siguiente carga a tratar. Se introduce para darle mas flexibilidad a las operaciones (por ejemplo que se pueda alargar el tiempo de reacción dependiendo de las características particulares del influente). Además el desecho periódico de lodos puede realizarse durante el tiempo muerto. Este tiempo puede ser eliminado si se cuenta con un sistema de dos tanques donde al momento que uno haya acabado de llenarse el otro halla terminado la fase de extracción de sobrenadante y está listo para recibir una nueva carga de agua para tratar.

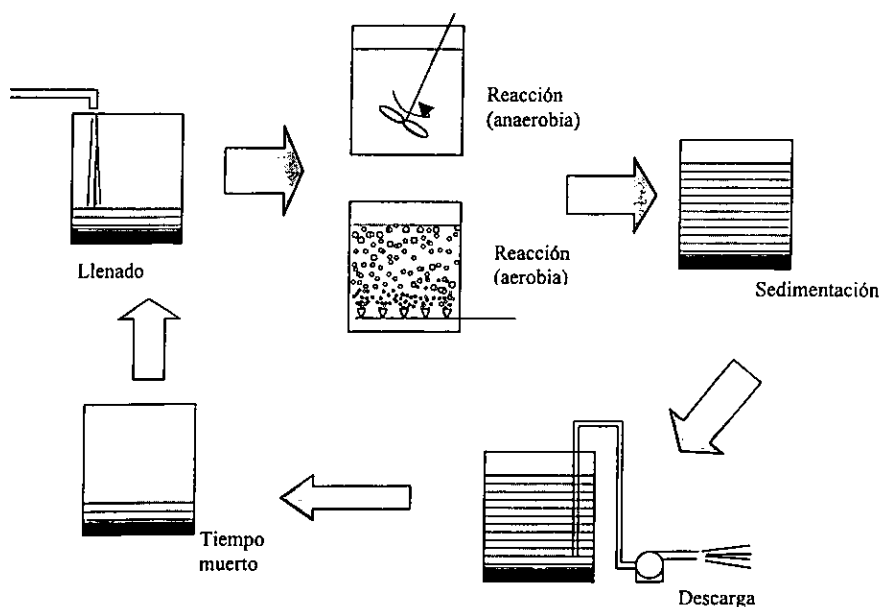


Figura 1.1.1. Diagrama de operación de un reactor SBR

1.1.2.2 Ventajas de los procesos SBR

Los procesos SBR muestran algunas ventajas sobre los procesos continuos, entre ellas (Zitomer y Speece, 1993):

- 1.- En un solo recipiente se realizan actividades de equalización, reacción biológica y sedimentación.
- 2.-Muestran mayor flexibilidad de operación, ya que dependiendo de las cualidades puntuales del influente que se reciba, los tiempo asignados a cada una de las tareas realizadas puede variarse.
- 3.-Existe un mayor gradiente de oxígeno disuelto durante la primera fase del ciclo de reacción debido a que las concentraciones del oxígeno disuelto luego de la fase de llenado son cero o muy bajas, esto provoca más eficiencia en los equipos de aeración.
- 4.-Un SBR funciona como tanque de equalización durante la etapa de llenado, lo que hace que puede tolerar flujos pico y cargas orgánicas muy altas sin detrimento de la calidad del efluente.
- 5.- El mejor aprovechamiento del tiempo de residencia en el biotratamiento de un efluente cuando se da por supuesto que la velocidad de la reacción sigue una cinética del tipo Monod para reacciones enzimáticas, se alcanza con un reactor de tipo flujo tapón seguido por un reactor totalmente mezclado (CSRT). El reactor de tipo flujo tapón no ha podido ser implementado en los reactores biológicos de tratamiento de aguas. El tipo de reactor más parecido a un flujo tapón que se puede construir es entonces el reactor batch, ya que realiza en el tiempo lo que un flujo tapón realiza en el espacio. Además el tiempo de llenado del reactor puede aproximarse a un CSTR, con lo que se obtendría el sistema flujo tapón-CSTR deseado.
- 6.-Se ha demostrado que los lodos que se generan en un reactor SBR tienen mejores propiedades de sedimentabilidad que los lodos del proceso continuo.
- 7.- La variación en las concentraciones del sustrato permite una mayor selección sobre la población bacteriana. Al inicio de la etapa de reacción, la concentración de sustrato es

máxima y al final de la etapa de reacción alcanza su valor mínimo. Dicho gradiente impone una presión que favorece a las bacterias mejor adaptadas para competir por el sustrato favoreciendo la selección de bacterias.

I.2 Aplicación de procesos biológicos en la degradación de compuestos xenobióticos

I.2.1 Introducción

El requerimiento mínimo de todo proceso biológico es que la información genética necesaria para codificar las enzimas necesarias para la degradación exista. El objetivo del tratamiento biológico es desarrollar una comunidad microbiana que convierta gran variedad de compuestos orgánicos a material celular nuevo que pueda ser removido por técnicas de separación convencionales y a compuestos inorgánicos no peligrosos como CO₂ y agua.

Los compuestos orgánicos naturales son biodegradables y sirven como fuente de carbón y energía para microorganismos que han evolucionado durante todo el tiempo geológico para aprovecharlos. En contraste, los compuestos xenobióticos han sido sintetizados y liberados al ambiente por los humanos en épocas relativamente recientes y su aprovechamiento puede representar un gran desafío para los organismos heterótrofos. La inclusión de enlaces químicos inusuales o grupos halógenos pueden hacer a una molécula difícil de degradar.

Por mucho tiempo se pasó por alto el potencial de los microorganismos para degradar sustancias xenobióticas, siendo estas tratadas casi siempre por incineración, adsorción con carbón activado o algún otro método fisicoquímico.

El hecho es que la mayoría de los compuestos orgánicos tóxicos pueden tratarse biológicamente si se logra establecer la adecuada distribución de microorganismos. Algunos compuestos son recalcitrantes y pueden no ser degradados en un ambiente particular, mientras que otros son solo parcialmente degradados o convertidos en otros productos. Una sustancia tóxica para un microorganismo puede ser una valiosa fuente de carbono para otro.

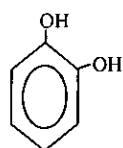
Dentro de los compuestos xenobióticos, para los que se ha probado el potencial de microorganismos para su degradación, se hallan gran variedad de compuestos aromáticos policlorados y nitrados, algunos de ellos considerados casi inatacables hasta hace poco, tal

como el pentaclorofenol y el trinitrotolueno. Además muchos colorantes azo y polifenilos han podido tratarse biológicamente.

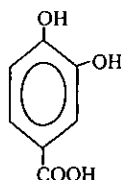
I.2.2 Degradación microbiana de compuestos aromáticos

I.2.2.1 Vías oxigenolíticas (aerobias) de ataque a anillos aromáticos

La mayoría de los compuestos aromáticos son degradados en un paso inicial a catecol y protocatehuato (figura I.2.2.1). Se degradan a catecol los anillos aromáticos con una sola sustitución o sustituidos en las posiciones 1 y 2. A protocatehuato se degradan los anillos aromáticos con dos sustituyentes en las posiciones 1,3 y 1,4 o que tengan mas sustituyentes (Gorontzy *et al.*,1993).



Catecol



Protocatehuato.

Figura I.2.2.1

Una vez que el compuesto aromático ha sido convertido en catecol o protocatehuato, el anillo aromático puede ser roto por dos vías determinadas por dioxigenasas. Estas son:

- Ruptura orto o intradiol (figura I.2.2.2). El anillo se rompe entre los dos carbonos vecinos hidroxilados.
- Ruptura meta o extradiol (figura I.2.2.3). El anillo aromático no se abre entre los átomos de carbono que cargan con los grupos alcohol. La ruptura da lugar a la formación de un semialdehído del 2-hidroximuconato. Posteriormente, de acuerdo al ácido alifático que se produce se incorpora como piruvato, oxaloacetato, acetaldehído, fumarato o succinato.

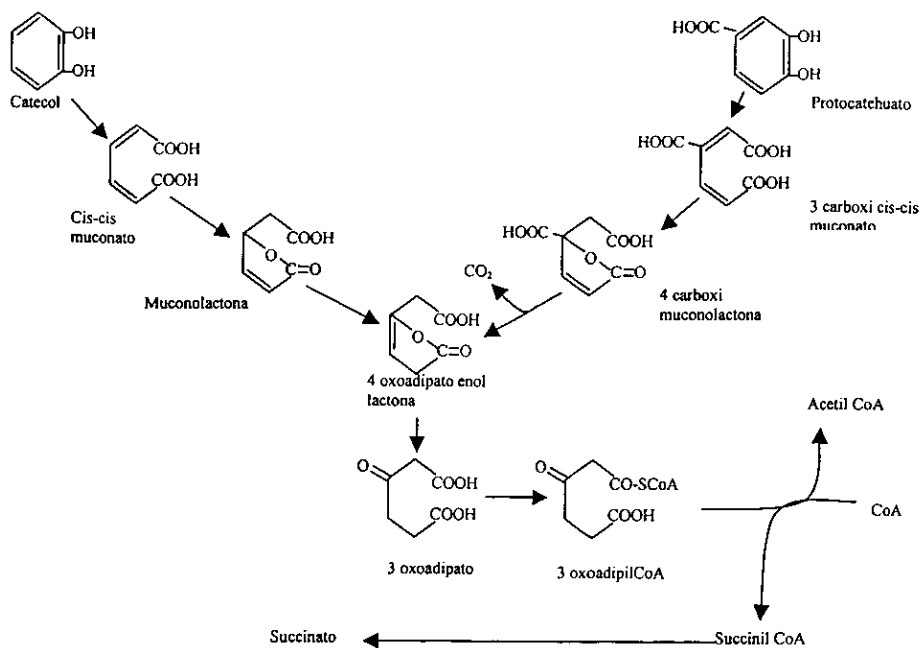


Figura 1.2.2.2 Ruptura orto o intradiol



La forma en que las bacterias convierten al compuesto aromático en un catecol o un protocatehuato depende del compuesto que se trate. En el caso del benceno, una dioxigenasa lo convierte a catecol, el tolueno es convertido a benzoato que al descarboxilarse se convierte en catecol (figura I.2.2.4). Para los clorofenoles se ha demostrado la desclorinación reductiva del compuesto.

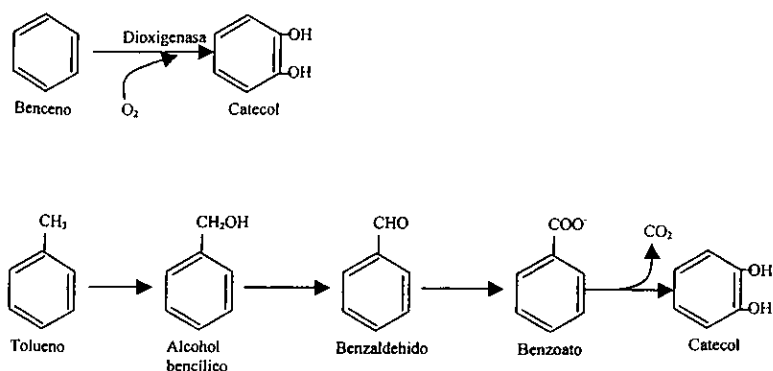


Figura 1.2.2.4. Conversión a catecol de benceno y tolueno

1.2.2.2 Vías de degradación reductiva (anaerobia) de compuestos aromáticos

En condiciones anaerobias el ataque a los anillos aromáticos se hace mediante la reducción de los carbonos del anillo dando lugar a una desaromatización y un posterior rompimiento del anillo (Marvin-Sikkema y de Bont, 1994).

1.2.2.3 Vías de degradación en ambientes anaerobios y aerobios alternantes

En algunas ocasiones se han empleado con éxito secuencias anaerobia-aerobia para reducir la toxicidad de los compuestos de otro modo recalcitrantes. Estas secuencias habían sido utilizadas sin darse cuenta ya que las coladeras o depósitos donde se mezclaban las aguas residuales hacían de ellos un pre- reactor anaerobio.

Se han empleado secuencias anaerobia - aerobia en compuestos para los cuales (Zitomer y Speece, 1993; Field *et al.*, 1995):

1. La primera etapa de transformación es una reacción reductiva.

Tal es el caso del ataque a los clorofenoles, donde el primer paso de degradación es la descloración reductiva del compuesto. Otro ejemplo son los colorantes azo, cuya degradación implica la reducción del enlace $R-N=N-R'$ a dos grupos amino $R-NH_2$ y H_2N-R' .

2. Una reacción reductiva previa a la aerobia detoxifica el compuesto o facilita su ataque.

Este es el caso de los compuestos como el nitrotolueno y el TNT. Se ha observado que las correspondientes formas amino de estos compuestos son mucho menos tóxicas y mas fáciles de atacar que las nitro. En este caso una etapa anaerobia reduce el $-NO_2$ a $-NH_2$ y una etapa aerobia trata el compuesto amino que resulta (Marvin-Sikkema y de Bont, 1994).

I.3 Biodegradación de compuestos nitroaromáticos

I.3.1 Introducción

Los compuestos nitroaromáticos se hallan presentes abundantemente en el medio ambiente y han sido detectados en las aguas de desecho, ríos, en suelos tratados con pesticidas y en el aire.

La mayor parte de los nitroaromáticos entran al ambiente debido a las actividades humanas. Sin embargo, se ha encontrado que unos pocos compuestos nitro-aromáticos son sintetizados por los microorganismos como el alcohol 4-nitrobencílico y el 4-nitrobenzoato que se producen por la degradación del cloranfenicol y el 4-nitroanisol es producido por cierta clase de hongos.

Compuestos como el nitrobenzeno, los nitrotoluenos, nitrofenoles y nitrobenzoatos son de considerable importancia industrial. Son con frecuencia usados como pesticidas, explosivos, colorantes, polímeros, farmacéuticos o en la producción de estos compuestos y sirven como solventes o precursores de los derivados aminoaromáticos. Algunos de estos compuestos (como el 2,4,6-trinitrotolueno y el nitrobenzeno) se producen en cantidades del orden de varios miles de toneladas al año.

Se ha demostrado que muchos nitroaromáticos son tóxicos o mutagénicos para muchas formas de vida. El 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), 2,4-dinitrotolueno (2,4-DNT) y 1,3-nitrobenzeno son tóxicos para muchas bacterias, levaduras, algas unicelulares y larvas y ha sido demostrado que causan , entre otras, hepatitis y anemia en humanos (Spain,1995).

También los productos de la transformación de los nitroaromáticos son mutagénicos. La mutagenicidad de hidrocarburos policíclicos nitrados, como el 1-nitropireno es causada por su conversión a nitroso- y N-hidroxiaminoaromáticos por enzimas de mamíferos como la citocromo P-450 reductasa y reductasas microbiales (Oren *et al.*,1991)

A pesar de la toxicidad de los nitroaromáticos, muchos microorganismos son capaces de degradar o transformar estas sustancias. Podría parecer que las enzimas envueltas en el ciclo del nitrógeno podrían estar involucrada en la transformación de nitroaromáticos, pero un examen más detallado muestra que la química de estas moléculas y sus reacciones son muy distintas y que las enzimas envueltas en su biotransformación son muy diferentes a las del ciclo biogeoquímico del nitrógeno.

Se ha hallado que muchos organismos, tal vez la mayoría, contienen enzimas que catalizan la transformación del grupo nitro. El ejemplo más claro lo constituyen la amplia variedad de enzimas redox que sirven como nitroreductasas. Mucho menos comunes son las enzimas y los caminos catabólicos que le permitan a las bacterias usar a los nitroaromáticos como su fuente de nitrógeno y carbono para crecer. Recientemente algunos de estos caminos se han descubierto y son objeto de amplios estudios buscando no solo sus mecanismos y orígenes evolutivos, sino también su potencial para aplicaciones biotecnológicas.

I.3.2 Química del grupo nitro en compuestos aromáticos

El grupo nitro existe como un híbrido de resonancia. Debido a que los átomos de oxígeno son más electronegativos que el átomo de nitrógeno, la polarización de los enlaces nitrógeno-oxígeno causan que el nitrógeno tenga una carga parcial positiva y sirva como electrófilo. Por esto, la reacción más común del grupo nitro en sistemas biológicos es la reducción, la cual puede proceder vía un electrón o dos electrones, además el hierro (II) y compuestos reducidos de azufre pueden servir como reductores para la reducción no enzimática de estos compuestos (Spain, 1995). Tanto el grupo nitro como el amino son muy estables, sin embargo, la secuencia de reacciones envueltas en la reducción del grupo nitro hacia la amina produce intermediarios muy reactivos. El grupo nitroso y el hidroxilamino son electrolitos que pueden interaccionar con moléculas biológicas para causar efectos tóxicos, mutagénicos o carcinogénicos.

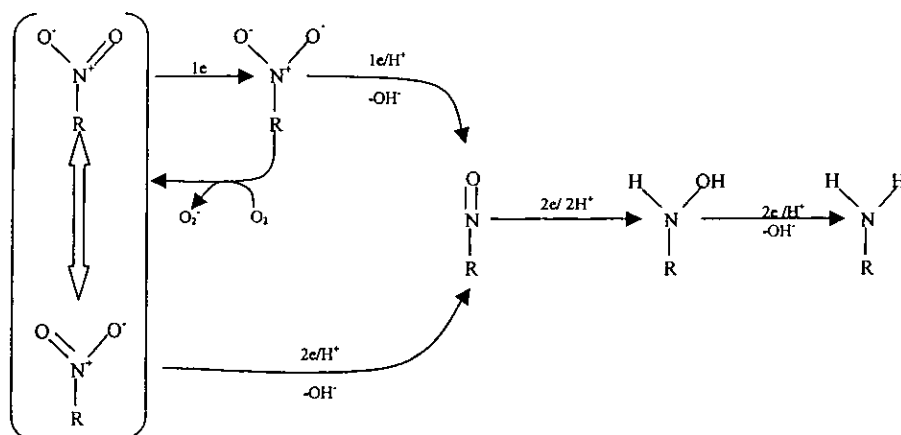


Figura I.3.1 Reducción del grupo nitro por mecanismos de 1 electrón y de dos electrones

El mecanismo de un electrón para la reducción del grupo nitro produce un radical anión nitro, que puede ser oxidado al compuesto no reducido por oxígeno molecular con la concomitante producción de superóxido. Es debido a este ciclo de retorno al compuesto no reducido que se ha llamado a las enzimas que catalizan la reducción por un electrón del grupo nitro como "enzimas sensibles al oxígeno". Las enzimas de una gran variedad de fuentes, entre las que se incluyen las de bacterias anaerobias estrictas como *Clostridium sp*, facultativas como *Escherichia coli sp.*, así como de plantas y animales, catalizan la reducción del nitroaromático por vía de un electrón (Spain, 1995).

La reducción del grupo nitro por adición de pares de electrones es "insensible al oxígeno" porque no se producen radicales. Las nitroreductasas de este tipo convierten a los grupos nitro ya sea a hiroxilaminas o aminas por la adición de pares electrónicos de nucleótidos de piridina reducidos. El camino de la reacción incluye a los derivados nitrosos, pero éstos no pueden detectarse por ser muy reactivos e inestables. La enorme reactividad del grupo nitroso y el hidroxilamino es responsable de mucha de la mutagenicidad y reactividad atribuida a los nitroaromáticos. Ambas estructuras pueden fácilmente reaccionar con gran cantidad de sustancias biológicas y también pueden llevar a cabo reacciones de condensación. Por ejemplo, la reducción parcial del grupo nitro en presencia de oxígeno da lugar a la producción no enzimática de productos de condensación azoxi.

La facilidad de reducción del grupo nitro depende de la naturaleza de los otros sustituyentes del anillo y en el poder reductor del ambiente. Los sustituyentes electronegativos activan la molécula hacia la reducción del grupo nitro, mientras los sustituyentes donadores de densidad electrónica hacen el anillo más susceptible al ataque electrofílico. En el caso de nitrotoluenos, la probabilidad de reducción se incrementa y la probabilidad de ataque electrofílico disminuye al aumentar el número de sustituyentes nitro. De tal manera, la reducción de un grupo nitro del TNT es muy rápida en la mayoría de los ambientes, incluyendo algunos donde hay bacterias aerobias. En contraste, la reducción del 2-amino-4,6-dinitrotolueno requiere un potencial de reducción menor y la reducción de 2,4-diamino-6-nitrotolueno requiere un potencial redox por debajo de los -200mV, porque las propiedades de donar densidad electrónica de los grupos amino baja la deficiencia electrónica de la molécula.

I.3.3 Degradación anaerobia de compuestos nitroaromáticos

Las reacciones de los nitroaromáticos en sistemas anaerobios consisten casi exclusivamente en la reducción del grupo nitro. Muchas especies de bacterias y hongos son capaces de reducir los compuestos nitroaromáticos a aminas aromáticas. Las nitroreductasas de estos organismos parecen tener un amplio espectro de sustratos, en contraste con las reductasas de organismos capaces de usar a los nitroaromáticos como única fuente de carbono y energía.

I.3.3.1 Reducción del grupo nitro sin mineralización del compuesto (Spain, 1995)

La gran mayoría de bacterias (Ver tabla I.3.1) en condiciones anaerobias solo pueden transformar el compuesto nitroaromático a aminoaromático, pero no pueden utilizarlo como fuente de carbono o nitrógeno.

La reducción del grupo nitro ha mostrado ser en la mayor parte de los casos una reacción fortuita de varios sistemas enzimáticos de oxidoreducción, en otros casos se piensa que el nitroaromático actúa como receptor final de electrones en sustitución del O_2 .

Entre los sistemas enzimáticos que más se han estudiado están :

- 1.- Cloroplastos iluminados con indofenol como reductor.
- 2.- H_2 -hidrogenasa y ferredoxina de *Clostridium pasteurianum* y *Veillonella alcalenses*.
- 3.- NADPH nitroreductasas de *Nocardia* y *Bacteroides fragilis*.
- 4.- Nitroreductasas extracelulares de bacterias anaerobias en el tracto gastrointestinal. Estas últimas enzimas pueden reducir el grupo nitro independientemente de la posición en el anillo.
- 5.- La enzima sulfito-reductasa de algunas especies de *Desulfovibrio*.
- 6.- Ferredoxina reducida vía no-enzimática: Estudios con *Clostridium pasteurianum* y *Clostridium thermoaceticum* revelaron que en presencia de ferredoxina reducida no se necesita enzima para reducir el 2,4-di-amino-nitrotolueno a 2,4-diamino-6-hidroxilaminotolueno. Esto sugiere que las enzimas no son específicas para reducir el nitroaromático sino que solo reducen la ferredoxina u otros portadores de electrones los cuales después reducen al nitroaromático de forma no-enzimática. Por lo tanto la gran distribución de enzimas nitroreductasas no específicas sensibles al oxígeno entre los

sistemas biológicos parece no ser sino la gran distribución de enzimas redox entre los microorganismos.

Se cree que muchas de las reducciones en condiciones anaerobias pueden ser atribuidos a la propiedad de muchos nitroaromáticos de ser reducidos de forma noenzimática por una gran variedad de reductores como el hierro (II), los sulfhidrilos y acarreadores de electrones como la ferredoxina.

1.3.3.2 Reducción con transformación ulterior del compuesto nitroaromático

Mucho menos comunes en el reino de los microorganismos son los sistemas capaces de mineralizar el compuesto nitroaromático o de usarlo como fuente de nitrógeno en condiciones anaerobias.

Especies dentro de las bacterias sulfato-reductoras han sido halladas capaces de aprovechar el TNT y otros nitroaromáticos, como fuente de nitrógeno. En ellas se ha observado que utilizan los nitroaromáticos como aceptores finales de electrones de la cadena respiratoria reduciéndolos a las aminas correspondientes, y se ha propuesto que quitan el grupo amino del anillo por deaminación reductiva.

Cepas de *Clostridium bifermentans* son capaces de mineralizar TNT a niveles no detectables. Estas bacterias primero reducen el TNT a triaminotolueno (McCormick *et al.*, 1978). Luego hidrolizan los grupos aminos convirtiéndolo a la sustancia en 2,4,6-trihidroxitolueno y por reacciones de deshidroxilación reductiva el compuesto se lleva hasta 4hidroxitolueno que es convertido a compuestos simples y asimilado por la cepa.

Parece ser que los sistemas mixtos (de varias especies de bacterias) han podido ser adecuados para la mineralización de ciertos compuestos nitroaromáticos en condiciones anaerobias ya que se han reportado cultivos mixtos de bacterias metanogénicas que son capaces de mineralizar el 2-nitrofenol, pero no pueden hacer lo mismo con el 4-nitrofenol, al que solo pueden reducir. Esto sugiere que las enzimas que mineralizan los compuestos nitroaromáticos en condiciones anaerobias son mucho más específicas que las nitroreductasas que fortuitamente transforman los nitrofenoles a aminofenoles.

Tabla 1.3-1. Microorganismos que reducen nitroaromáticos pero son incapaces de mineralizarlos. (Marvin-Sikkema y de Bont, 1994; Blasco y Castillo, 1992; Roldán *et al.* 1998)

Microorganismo	Sustrato.
<i>Bacteroides fragilis</i>	1-Nitropireno
<i>Clostridium clostridiforme</i>	1-nitropireno, 1,3- y 1,6- dinitropireno
<i>Clostridium leptum</i>	1-nitropireno, 1,3- y 1,6- dinitropireno
<i>Clostridium paraputrificum</i>	1-nitropireno, 1,3- y 1,6- dinitropireno
<i>Clostridium pasteurianum</i>	3-NF, 4-NF, 2,4-DNF, 4-NBA, 4-nitroanilina y TNT
<i>Clostridium perfringens</i>	1-nitropireno, 1,3- y 1,6- dinitropireno
<i>Clostridium</i> sp.	1-nitropireno, 1,3- y 1,6- dinitropireno
<i>Clostridium</i> sp. tipo W1	3-NF, 4-NF, 2,4-DNF, 4-NBA, 4-nitroanilina y TNT
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	3-NF, 4-NF, 2,4-DNF, 4-NBA, 4-nitroanilina y TNT
<i>Desulfovibrio gigas</i>	3-NF, 4-NF, 2,4-DNF, 4-NBA, 4-nitroanilina y TNT
<i>Desulfovibrio</i> sp. tipo AS	3-NF, 4-NF, 2,4-DNF, 4-NBA, 4-nitroanilina y TNT
<i>Desulfovibrio</i> sp. tipo B	TNT, 2,4-DNF, 2,4-DNT, 2,6-DNT
<i>Desulfovibrio</i> sp. tipo GB	3-NF, 4-NF, 2,4-DNF, 4-NBA, 4-nitroanilina y TNT
<i>Desulfococcus multivorans</i>	4-NF
<i>Desulfomaculum orientis</i>	4-NF
<i>Desulfomaculum</i> sp. GROL	3-NF, 4-NF, 2,4-DNF, 4-NBA, 4-nitroanilina y TNT
<i>Enterobacter cloacae</i>	4-Cl-2-NF
<i>Escherichia coli</i>	TNT, 4-NBA, nitrofurazona, dinitrotoluenos
<i>E. coli</i> B-3468	Me-4-NBA
<i>E. coli</i> B/r	Me-4-NBA
<i>Eubacterium</i> sp.	1-Nitropireno, 1,3- y 1,6-dinitropireno
<i>Haloanaerobium preavalens</i> DSM 2228	NB, 2-NF, 3-NF, 4-NF, nitroanilinas, 2,4-DNF, 2,4 dinitroanilina
<i>Methanobacterium formicicum</i>	3-NF, 4-NF, 2,4-DNF, 4-NBA, 4-nitroanilina y TNT
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	3-NF, 4-NF, 2,4-DNF, 4-NBA, 4-nitroanilina y TNT
<i>Methanoculleus oldenburgensis</i>	3-NF, 4-NF, 2,4-DNF, 4-NBA, 4-nitroanilina y TNT
<i>Methanogenium tationis</i>	3-NF, 4-NF, 2,4-DNF, 4-NBA, 4-nitroanilina y TNT
<i>Methanosarcina barkeri</i>	3-NF, 4-NF, 2,4-DNF, 4-NBA, 4-nitroanilina y TNT
<i>Methanosarcina frisia</i>	3-NF, 4-NF, 2,4-DNF, 4-NBA, 4-nitroanilina y TNT
<i>Methanosarcina</i> sp. tipo KS2002	3-NF, 4-NF, 2,4-DNF, 4-NBA, 4-nitroanilina y TNT
<i>Methanospirillum hungatei</i>	3-NF, 4-NF, 2,4-DNF, 4-NBA, 4-nitroanilina y TNT
<i>Nocardia</i> sp. tipo V	1,4-DNB
<i>Pseudomonas acidovorans</i> ATCC 15005	4-NBA, 3-CINB
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 17933	4-NBA, 3-CINB
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 4359	4-NBA, 3-NP, 3-CINB
<i>P. putida</i> ATCC 23937	4-NBA, 3-CINB
<i>Pseudomonas</i> sp. tipo CBS3	2-,3-,4- CINB, 2-NBA, 3-NBA, 4-NBA, 2-NF, 3-NF, 4-NF, 1-Cl-2,4-DNB, TNT
<i>Pseudomonas</i> sp. tipo FR2	TNT
<i>Rhodobacter capsulatus</i> E1F1	2,4-DNF, 2-NF, 3-NF, 4-NF
<i>Rhodospiridium</i>	4-CINB
<i>Rhodotorula glutinis</i>	2,3-DNT, 2,4-DNT, 3,4-DNT, 2,5-DNT
<i>Sporohalobacter marismortui</i> ATCC 35420	2-NF, 3-NF, 4-NF, NB, nitroanilinas, 2,4-DNF, 2,4-dinitroanilina
<i>Veillonella alcalensens</i>	TNT

NF=nitrofenol, DNF=dinitrofenol, NBA=nitrobenzoato, NB=nitrobenzeno, DNT=dinitrotolueno, TNT=trinitrotolueno

I.3.4 Degradación aerobia de compuestos nitroaromáticos

Algunas bacterias aerobias pueden usar a los nitrofenoles como fuente de carbono, nitrógeno y energía, en contraste con las transformaciones anaerobias que son en su mayoría no específicas y fortuitas. En la actualidad son conocidos varios mecanismos por los cuales las bacterias aerobias atacan los anillos aromáticos, estas son:

- Una oxigenación inicial que produce nitrito.
- Una reducción inicial que produce aminas aromáticas, las que son luego metabolizadas.
- Una completa eliminación reductiva de el grupo nitro produciendo nitrito.
- Una reducción parcial del grupo nitro a una hidroxilamina la cual, luego de llevar a cabo reacciones de remplazamiento, es metabolizada.

Los compuestos aromáticos que resultan de cualquiera de estos cuatro caminos son degradados por las vías del catecol y protocatehuato vistas con anterioridad.

En casi todos los casos estudiados los nitroaromáticos sirven como fuente de carbón y energía. Solo en casos excepcionales los compuestos se usan como fuente de carbono.

En seguida se detallan cada una de estas vías, así como los compuestos que son atacados por ellas y cuales microorganismos se sabe que las utilizan.

I.3.4.1 Remoción oxigenolítica del grupo nitro de los compuestos nitroaromáticos

La remoción oxidativa del grupo nitro del núcleo aromático ha sido demostrada con varias poblaciones bacterianas que utilizan al nitroaromático como fuente de carbono y energía así como en algunas bacterias que no mineralizan los nitroaromáticos sino que solo los usan como una fuente de nitrógeno.

Las enzimas responsables de retirar el grupo nitro como nitrito han sido aisladas y purificadas en la *Pseudomonas putida* observándose que el espectro de acción de esta enzima es amplio, incluyendo moléculas de varios 2-nitrofenoles halo-sustituidos y alquil-sustituidos. Esta enzima cataliza la conversión de 2-nitrofenol a catecol. En *Moraxella* sp. ha sido hallada una enzima similar pero que actúa sobre el 4-nitrofenol, convirtiéndolo a quinona (Bruhn *et al.*, 1987; Dickel y Knackmuss, 1991).

Los metabolismos mostrados por las cepas anteriores comienzan quitando del grupo nitro del anillo y sustituyéndolo por un oxhidrilo, en contraste, algunas bacterias convierten los nitroaromáticos a nitrocatecoles antes de remover el grupo nitro como nitrito (figura I.3.2). Bacterias como *Flavobacterium* sp. convierte el nitrofenol a nitrocatecol como paso inicial del ataque y algunas cepas de *Pseudomonas* y *Nocardia* transforman el nitrobenceno a nitrocatecol. Se ha mostrado en muchos organismos que el convertir el nitroaromático a nitrocatecol es catalizado por enzimas codificadas por el plásmido TOL. En *Norardia* sp ambas rutas están presentes. Cual de ellas predomine depende de la presencia del plásmido (Zeyer *et al.*, 1986).

La remoción oxigenolítica ha sido observada también en nitroaromáticos con dos y tres grupos nitro.(Tabla I.3-2).

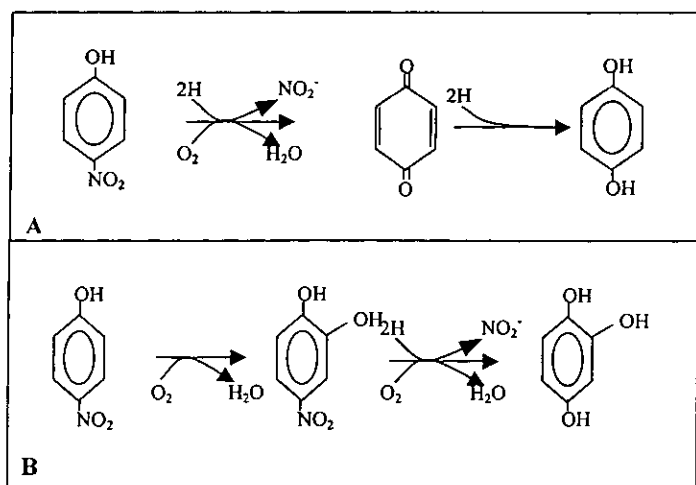


Figura I.3.2. Remoción oxigenolítica del grupo nitro vías A) remoción inicial como nitrito y B) Formación inicial de nitrocatecol

Tabla I.3-2. Microorganismos capaces de mineralizar completamente el compuesto nitroaromático después de la remoción oxigenolítica del grupo nitro (Marvin-Sikkema y de Bont, 1994; Spain y Gibson, 1991).

Microorganismo	Sustrato
<i>Alcaligenes eutrophus</i> JMP134	2,6 DNF
<i>Arthrobacter aureescens</i> TW17	4-NF
<i>Janthinobacterium</i> sp	2,4-DNF
<i>Moraxella</i> sp.	4-NF
<i>Nocardia</i> sp. tipo N-26-8	4-NF
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	2,4-DNT
<i>Pseudomonas</i> sp tipo N-26-8	2,6-DNF
<i>Pseudomonas</i> sp.	4-NF
<i>Pseudomonas</i> sp. tipo DNT	2,4-DNT
<i>Pseudomonas</i> sp. tipo N-1	3-nitrobencensulfonato
<i>Pseudomonas</i> sp. Tipo IIBx	TNT
<i>Pseudomonas</i> sp. Tipo I-2WT	TNT
<i>Pseudomonas putida</i> B2	2-NF
<i>Rhodococcus</i> sp. tipo QT-1	1,3-DNB

DNB=dinitrobenceno, DNF=dinitrofenol, NF=nitrofenol, DNT=dinitrotolueno, TNT=trinitrotolueno

I.3.4.2 Degradación del compuesto nitroaromático por reducción inicial del grupo nitro

Algunos microorganismos pueden degradar los compuestos nitroaromáticos mediante la reducción inicial del grupo nitro a una amina usando una nitroreductasa. La reducción procede vía un grupo nitroso y un hidroxiamino. El producto aminoaromático es luego degradado en la presencia de oxígeno por enzimas oxigenasas hacia amoniaco y catecol, éste último es después mineralizado por reacciones de apertura de anillo(figura I.3.3). Este camino está involucrado en la degradación de nitrobenzoatos, nitrotoluenos y nitrofenoles. Esta vía y la vía oxigenolítica pueden estar presentes en un mismo organismo (Zeyer y Kearney, 1984).

Algunas bacterias no son capaces de mineralizar completamente los nitroaromáticos después de reducir el grupo nitro, pero usan el amoniaco liberado como fuente de nitrógeno.

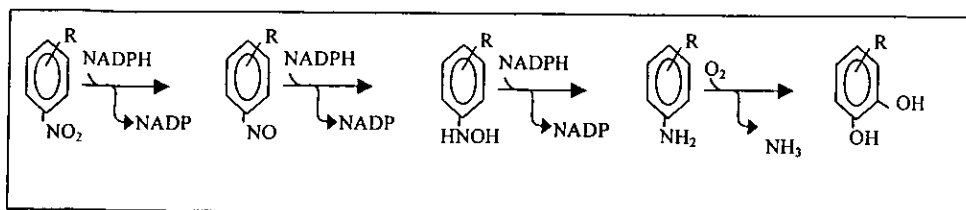


Figura I.3.3 Camino de la remoción del grupo nitro por reacciones iniciales de reducción.

Tabla I.3.3 Microorganismos capaces de mineralizar completamente el compuesto nitroaromático después de remover el grupo nitro vía reducción inicial hacia amina. (Marvin-Sikkema y de Bont, 1994; Schlenze *et al.* 1997)

Microorganismos	Sustrato.
<i>Flavobacterium</i>	2-NBA
<i>Nocardia alba</i>	2,4-DNF
<i>Nocardia erythropolis</i> CA4	4-NBA
<i>Nocardia opaca</i>	2-NBA, 4-NBA
<i>Nocardia</i> sp. tipo M1	2-NBA, 4-NBA
<i>Pseudomonas cepacia</i>	4-NBA
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4-NBA, TNT
<i>P. fluorescens</i> NC3	4-NBA
<i>Pseudomonas putida</i> B2	3-NF
<i>Pseudomonas</i> sp. tipo 1 y 4	2-NBA
<i>Pseudomonas</i> sp. tipo 2	3-NBA
<i>Pseudomonas</i> sp tipo 3 y 5	4-NBA
<i>Pseudomonas</i> sp. Tipo Y, I y III	TNT

NBA=nitrobenzoato, DNF=dinitrofenol, NF=nitrofenol, TNT=trinitrotolueno

I.3.4.3 Remoción del grupo nitro mediante reducción inicial del anillo aromático

Este camino está caracterizado por la remoción reductiva de uno de los grupos nitro como nitrito y la formación de un complejo de hidrido-Meisenheimer como uno de los metabolitos. La formación de este complejo indica que la descomposición se inicia por un ataque nucleofílico al anillo aromático, con la adición de un ion hidruro al anillo aromático para obtener el complejo. Para el ácido pícrico, el complejo se rearomatiza al perder un grupo nitrito (Figura I.3.4). El difenolato formado continua degradándose en condiciones aerobias, pero no está claro si es por reducciones ulteriores o por algún otro camino de

ataque a los nitroaromáticos. En condiciones anaerobias se obtiene 4,6-dinitrohexanoato al seguirse reduciendo el anillo del difenol (Lenke y Knackmuss,1992).

Los estudios de degradación del TNT han demostrado que las cepas que forman el complejo hidrido-Meisenheimer también reducen el grupo amino en condiciones aerobias, por lo que ambos procesos (reducción del anillo y reducción del grupo nitro) están en competencia. Solo en el ácido pícrico se ha demostrado que el complejo hidrido - meisenheimer juega un papel importante para la degradación.

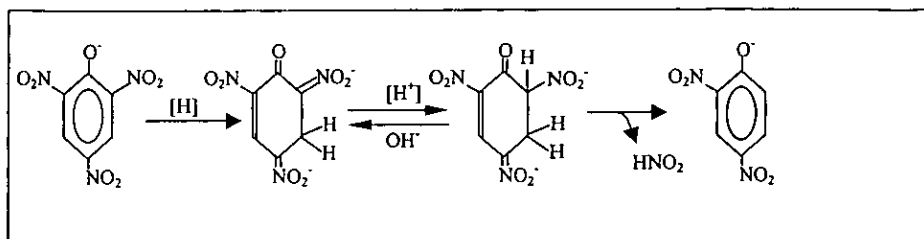


Figura I.3.4. Camino para la remoción del grupo nitro mediante una reducción del anillo aromático.

Tabla I.3.4. Microorganismos capaces de remover el grupo nitro después de una reducción del anillo aromático (Marvin-Sikkema y de Bont, 1994).

Microorganismos	Sustrato
Mycobacterium sp. tipo HL 4-NT-1	TNT
Pseudomonas sp. clon A	TNT
Rhodococcus erythropolis HL 24-1	2,4-DNF
Rhodococcus erythropolis HL PM-1	Acido pícrico.

TNT=trinitrotolueno, DNF=dinitrofenol

I.3.4.4 Degradación de nitroaromáticos vía reducción parcial y reacciones de remplazamiento

Recientemente se ha encontrado una cuarta vía por la cual los microorganismos remueven el grupo nitro durante la degradación de los nitroaromáticos (Nishino y Spain, 1993).

La degradación empieza con la reducción del grupo nitro hacia hidroxilamina, esta hidroxilamina no se convierte a catecol, sino a aminofenol. Esta reacción equivale al rearrreglo de Bamberger.(figura I.3.5).

Tabla I.3.5. Microorganismos capaces de mineralizar completamente el compuesto después de remover el grupo nitro por reducción parcial y reacciones de rearrreglo. (Marvin-Sikkema y de Bont, 1994).

Microorganismo	Sustrato
<i>Comanomas acidovorans</i> NBA-10	4-NBA
<i>Pseudomonas</i> sp. tipo 4NT	4-NT, 4-NBA, alcohol 4-nitrobencílico, 4-nitrobenzaldehído.
<i>Pseudomonas</i> sp. tipo TW3	4-NT, 4-NBA, alcohol 4-nitrobencílico.

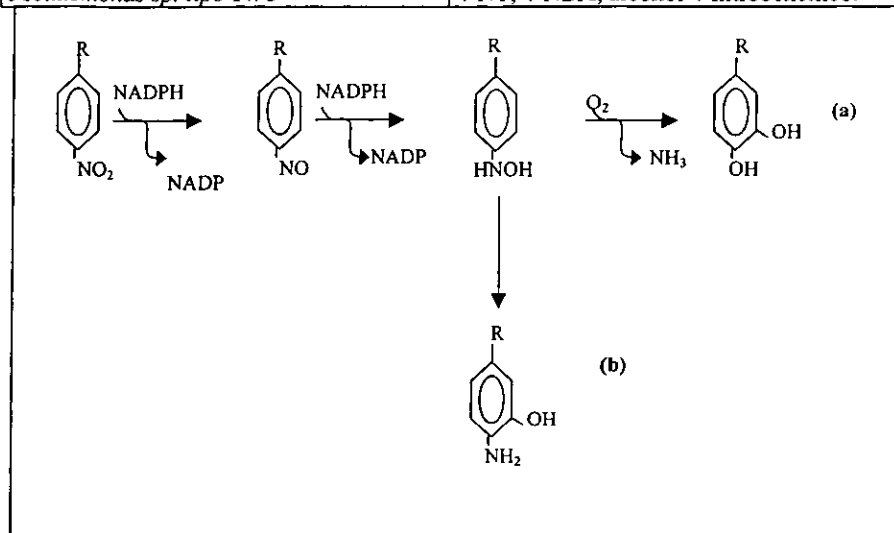


Figura I.3.5 Caminos propuestos para la degradación de nitroaromáticos vía la reducción a hidroxilaminas v a) reacciones de desnlazamiento o b) rearrrelos tino Bamernver.

I.3.5 Degradación de nitroaromáticos por hongos (Spain, 1995)

Se ha descubierto que algunos hongos son capaces de degradar los nitroaromáticos.

El 2-,3- y 4- nitrofenoles han sido degradados cometabólicamente por *Penicillium* sp Bi 7/2 creciendo en glucosa. También se ha demostrado que muchos hongos degradan el TNT reduciéndolo a aminoaromáticos. El hongo de raíz blanca *Phanerochaete chrysosporium* (Valli *et al.*,1992) , conocido por su habilidad de degradar aromáticos, es capaz de mineralizar TNT y 2,4-dinitrotolueno completamente. El camino usado para el 2,4-dinitrotolueno involucra su reducción inicial a 2-amino-4nitro-tolueno. Este producto es luego degradado por una secuencia que consiste en reducción, metilación y reacciones catalizadas por lignin-peroxidasa. El camino degradativo de *P. chrysosporium* para el TNT

también inicia con una reducción que produce aminodinitrotoluenos. El resto de la vía también está caracterizada por el uso de lignin-peroxidasas.

I.4 Importancia y estudios previos de la degradación del p-nitrofenol

I.4.2 Importancia industrial y usos de p-nitrofenol

El principal uso del paranitrofenol es como materia prima de herbicidas y colorantes. Para colorantes como precursor del 4-aminofenol el cual tiene amplio uso en la producción de colorantes tipo azo y sulfuros. Como precursor de herbicidas se usa como precursor directo de los parationes y el fluorodifeno.

La reacción del 4-nitrofenóxido de sodio con cloruro dialquiltiofosfórico se usa para producir una serie de insecticidas tipificados por el etil-paratión. El etil paratión está siendo sustituido por el metil-paratión ,menos tóxico que el primero, para el cual también se usa el 4-nitrofenoxido de sodio.

El 4-nitrofenol reacciona con el 4-cloro 3-nitrobenzotri fluoruro dando lugar al fluorodifeno, usado como herbicida principalmente para cultivos de arroz. Otros usos del paranitrofenol consisten en la preparación de fenetidina y acetofenetidina, un antipirético. Se usa como indicador acido-base, y como fungicida para el corcho. También se usa para la preparación de ciertos productos fotoquímicos y conservadores para pieles. (Schwarzenbach *et al.* 1988).

I.4.3 Degradación del p-nitrofenol

Los primeros reportes de degradación bacteriana de nitroaromáticos se hicieron precisamente para el paranitrofenol y desde entonces ha sido estudiado extensamente (Spain *et al.*, 1980; Spain y Van Veld, 1983; Spain *et al.*, 1994; Zaidi y Imam, 1996; Zaidi *et al.* 1988). Incluso su cualidad de poder ser medido colorimetricamente lo hacen atractivo para ilustrar la degradabilidad de xenobióticos en experimentos de cátedra donde *Pseudomonas putida* lo degrada aerobícamente (Zeyer y Kearney, 1984).

I.4.3.1 Transformaciones en ambientes aerobios

Se han encontrado varias especies de bacterias que pueden usar al nitrofenol como fuente de carbono y energía por vía aerobia. Su metabolismo comienza por la desnitración oxigenolítica del compuesto. Se han identificado dos caminos principales para hacer esto, en uno de ellos el compuesto es llevado a quinona que es abierta por una dioxigenasa. En el otro camino el compuesto se transforma como paso inicial a 1,2,3 bencenotriol. El camino usado depende de la bacteria que lo vaya a consumir (Heitkamp *et al.*, 1990; Duong *et al.*, 1997; Kadilaya y Spain, 1998; Spain *et al.*, 1994; Hallas y Alexander, 1983; Schmidt *et al.*, 1987; Jain *et al.*, 1994).

I.4.3.2 Transformaciones en ambientes anaerobios

Casi todos los estudios de la transformación del paranitrofenol en condiciones de anaerobiosis señalan que este se reduce a aminofenol de forma estequiométrica y que el aminofenol producido no continua siendo metabolizado por la cepa (Uberoi y Bhattacharya, 1997; Gorontzy *et al.*, 1993; Takenaka *et al.*, 1997; Boyd *et al.*, 1983; Donlon *et al.*, 1996).

Capítulo II. Metodología

II.1 Fundamento y plan de experimentación

II.1.1 Propuesta para la degradación del p-nitrofenol en ambientes anaerobio-aerobio alternados

Se ha visto que el grupo nitro de un compuesto aromático atrae densidad electrónica hacia sí, haciendo al anillo aromático poco activo para un ataque vía dioxigenasas, que es el principal método de ataque de las bacterias aerobias a los anillos aromáticos.

La gran electronegatividad del grupo nitro hace que sea fácil de reducir; una gran diversidad de bacterias en ambientes anaerobios reduce el grupo nitro hacia amino, formando el aminoaromático correspondiente. En la mayoría de los casos este aminoaromático formado no puede ser mineralizado por las bacterias anaerobias. En vista de esto si una vez formada la amina en ambiente anaerobio cambiamos a un ambiente aerobio la amina puede mineralizarse por vías oxigenolíticas.

El p-nitrofenol es uno de los compuestos nitroaromáticos que en ambientes anaerobios son convertidos estequiométricamente a aminas (aminofenol), las cuales no se siguen degradando en este ambiente. El aminofenol puede ahora tratarse por vías oxigenolíticas al introducir aire al reactor (figura II.1). Es por ello que el p-nitrofenol representa un compuesto adecuado para probar una estrategia de anaerobiosis- aerobiosis. Es también una sustancia de importancia industrial y considerado por la EPA como contaminante prioritario.

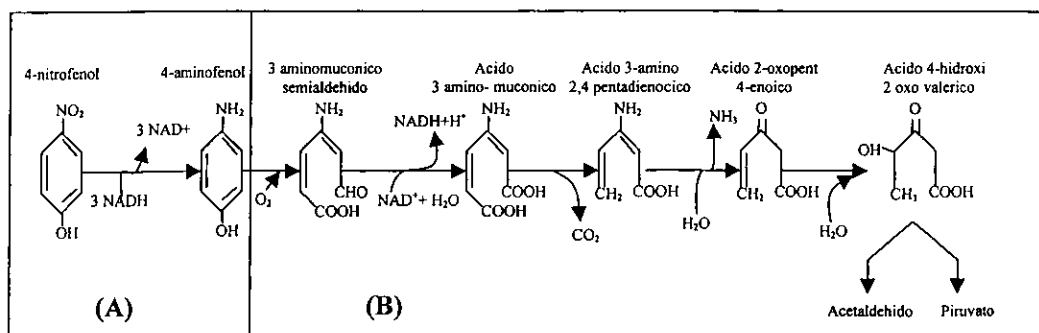


Figura II.1. Transformaciones sucesivas esperadas para el nitrofenol al pasar por una etapa anaerobia (A) seguida de una etapa aerobia (B)(Takenaka et.al.,1998)

II. 1.2 Estrategias de experimentación

Se probaron tres estrategias para el arranque de un reactor utilizado para la degradación del paranitrofenol. Dichas estrategias y la descripción de la operación de cada una se describen en los puntos que siguen.

II.1.2.1 Experimentación en operación tipo fed-batch (figura II.1.1)

Se llevó a cabo una experimentación para observar el comportamiento del sistema. Esta se manejó en fed-batch, es decir se alimentaban cantidades pequeñas de solución concentrada de paranitrofenol (PNF) sin retirar ningún efluente. En este experimento se trabajó a temperatura de 37°C para favorecer la velocidad de acción de los microorganismos anaerobios.(figura II-1.2)

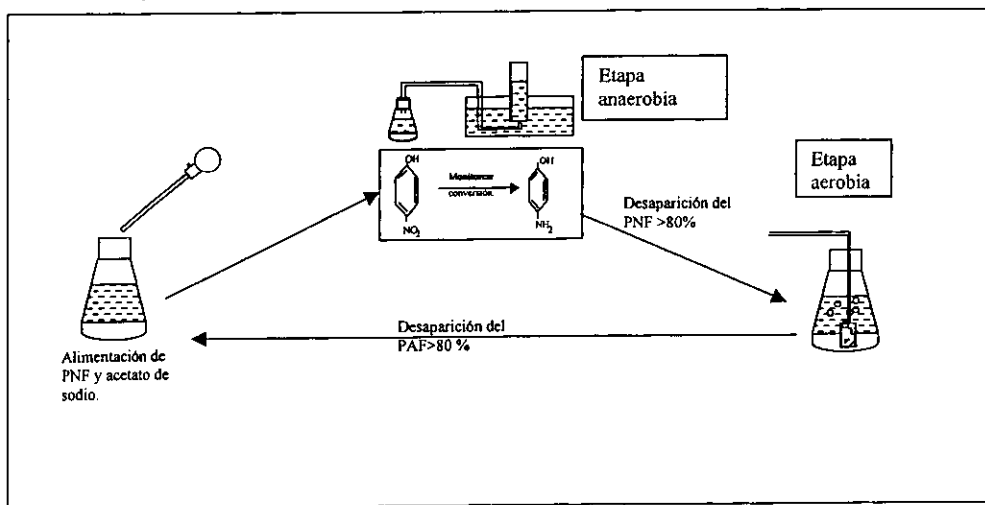


Figura II.1.1 Experimento preeliminar en operación tipo fed-batch

Las condiciones experimentales son las siguientes:

Reactor de biomasa suspendida de 8 litros inoculado con lodos de una planta de tratamiento de aguas domésticas, dando un contenido de sólidos suspendidos volátiles SSV de 2500 mg/l. Se operó a una temperatura de 37°C, y se monitoreó la concentración de paranitrofenol y para-aminofenol (PAF).

II.1.2.2 Operación con tiempos de reacción fijos (figura II.1.2)

En este modo de operación se fijaron los tiempos de reacción a un valor preseleccionado (en este caso 3.5 horas en etapa anaerobia y 2 en la etapa aerobia tiempos tomados de referencias sobre procesos de nitrificación- desnitrificación, ya que debe suponerse alguna similitud ya que esta presente el grupo NO_2), después de estos tiempos el volumen de reacción era descargado en el estado que estuviera.

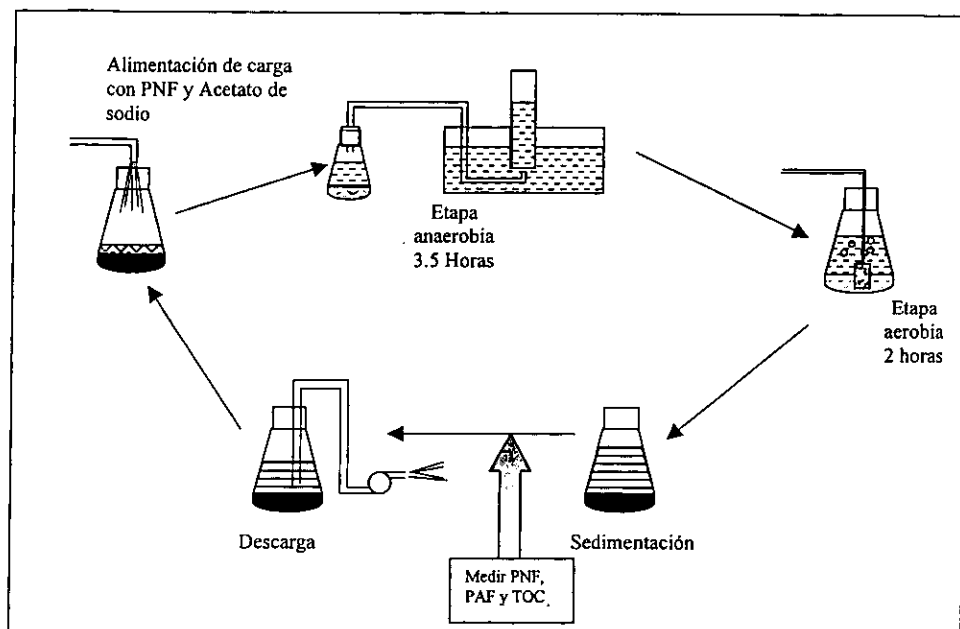


Figura II.1.2. Estrategia de operación con tiempos anaerobio y aerobio fijos.

Después de los tiempos de reacción el efluente era descargado y la concentración de PNF medida.

Para este sistema se operó un reactor de biomasa suspendida de 4 litros, inoculado con lodos de planta de tratamiento de aguas domésticas y se operó a temperatura ambiente. La cantidad de sólidos volátiles usada fue de 2500 mg/L, la concentración inicial de PNF

manejada fue de 21 mg/l y se agregó 66 mg/L de acetato de sodio como donador de electrones. Se monitoreó el oxígeno disuelto en las etapas anaerobia y aerobia así como la concentración de PNF y PAF.

11.2.3 Tiempos de reacción variables(figura II.1.3)

En esta estrategia los tiempos eran variados de tal forma que no se terminaba con una etapa sino cuando se obtenía una desaparición del 80% o más del paranitrofenol (etapa anaerobia) y del para aminofenol (etapa aerobia).

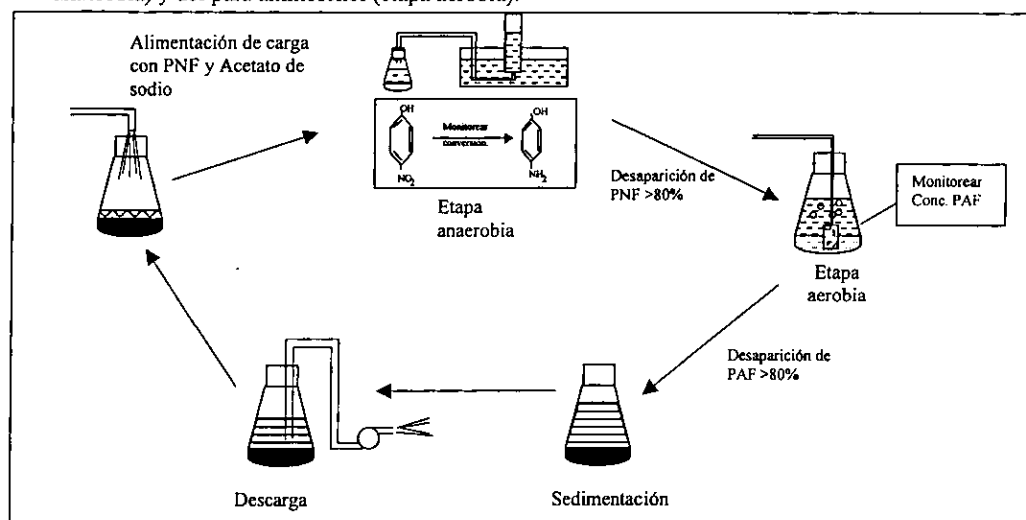


Figura II.1.3 Estrategia de operación con tiempos anaerobio y aerobio variables

El reactor operó como tipo SBR. La temperatura se mantuvo entre los 25 y 27°C. Los tiempos de sedimentación, carga y descarga manejados fueron de 30, 10 y 20 minutos, respectivamente. El volumen extraído cada vez era del 75 %.

Se comenzó con un inóculo de planta de tratamiento de aguas domésticas del cual se agregó lo suficiente para tener una concentración de sólidos volátiles de 2500 mg/L.

II.2 Material y métodos analíticos

II.2.1 Descripción del reactor utilizado

Para los tres casos descritos anteriormente se utilizó un reactor de vidrio de 1 litro de capacidad. Dicho recipiente se mantenía agitado por medio de un agitador magnético y se aireaba a través de un difusor de piedra porosa que recibía aire de un pequeño compresor. El reactor era cargado y descargado utilizando un par de bombas persitálticas (Masterflex, L/S 77913-00). Tanto el agitador, aireador así como las bombas eran controladas a través de un Timer (GRALAB digital timer, modelo 545/645) para las operaciones a tiempos fijos.

Para mantener la temperatura controlada el reactor era sumergido en un baño de agua cuya temperatura era mantenida en el nivel deseado con un calentador y monitoreada con un termómetro de alcohol.

El reactor fue sellado herméticamente mediante un tapón de goma el cual tenía perforaciones para las operaciones de carga, descarga, toma de muestra y entrada y salida de aire.

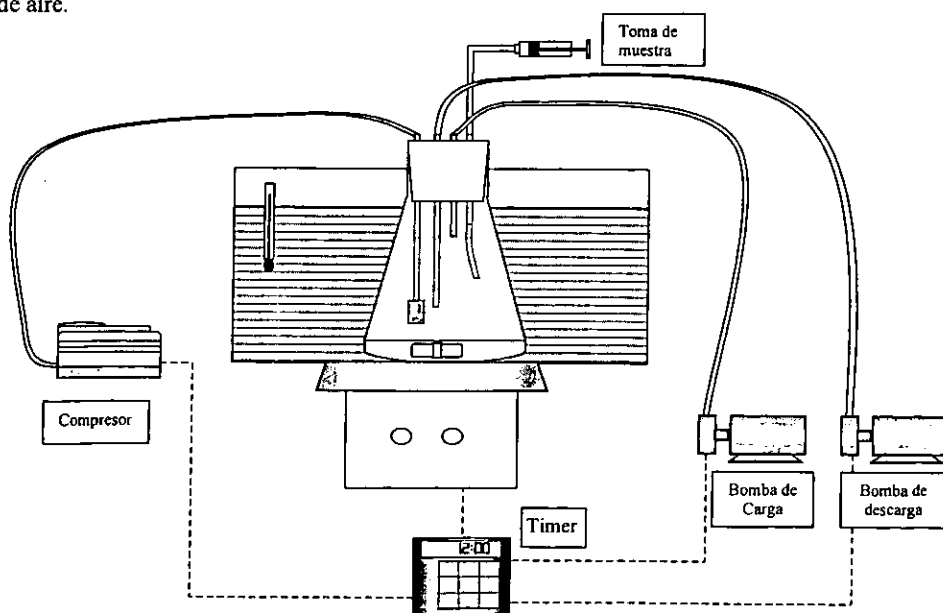


Figura II-2.1 Esquema de reactor utilizado

II.2.2 Métodos analíticos

El Paranitrofenol fue determinado colorimétricamente. A 1 ml de muestra se agregó 1ml de NaOH 1M y 8 ml de agua destilada, después se leyó la absorbancia a 400 nm utilizando un espectrofotometro.

Para el aminofenol se utilizó el método de p-dimetilaminobenzaldehído con ácido cítrico mencionado por Oren y Gurevich(1991). A 0.2 ml de muestra se agregó 0.8 ml de agua, 0.050 ml de HCl 1N, 3 ml de etanol, 0.5 ml de solución de ácido cítrico y 0,5 ml de p-dimetilaminbenzaldehído. La absorbancia era entonces determinada a 440 nm.

Los espectros UV fueron obtenidos luego de llevar la muestra a pH=7 agregando 0,5 ml de buffer de fosfatos a 10 ml de muestra y utilizando un espectrofotómetro Beckman.DU-650
Las mediciones de pH y potencial de oxido-reducción se llevaron a cabo utilizando un potenciómetro Orion 707.

Las mediciones de carbono orgánico total se llevaron a cabo en un analizador Shimadzu TOC-5050. Las mediciones de oxígeno disuelto se llevaron a cabo usando un medidor de oxígeno YSI DO-166. Las muestras tomadas de los reactores fueron filtradas primeramente con un filtro Whatam No.1, luego una membrana de 0,45µm. Las técnicas de solidos suspendidos fueron hechas de acuerdo a estándares de APHA (1995).

Capítulo III. Resultados

III.1 Operaciones a eficiencia constante en modo de operación fed-batch

La figura III.1.1 muestra los resultados de 3 ciclos consecutivos de operación bajo las condiciones arriba citadas. Se utilizó inicialmente 18 mg/l de PNF y 66 mg/l de acetato de sodio que sirviera de donador de electrones. Durante la anaerobiosis la conversión de para-nitrofenol a aminofenol fue casi estequiométrica $\approx 90\%$, la diferencia puede atribuirse a alguna mineralización de PNF en la etapa anaerobia.

Durante la etapa aerobia las aminas caen rápidamente, pero la aparición de un color pardo en la solución es indicativo de la eventual formación de polímeros de tipo húmico que el aminofenol forma con gran facilidad (Cha *et al.*, 1986). El efecto de la aclimatación de la población bacteriana puede notarse al compararse la longitud de ciclos consecutivos, el primero de 53 horas y los demás de 24 y 22 horas en forma respectiva.

Después de las corridas que se muestran se presentó una repentina pérdida de la actividad de los microorganismos hacia el aminofenol, un ennegrecimiento de la solución y los flóculos se dispersaron y dejaron de sedimentar. Pudo deberse a la acumulación de productos de autooxidación del para aminofenol que intoxicaron los microorganismos. Se concluye que es necesario renovar los volúmenes para no dejar que se acumulen. Factores como la temperatura elevada también favorecen la autooxidación y polimerización del aminofenol.

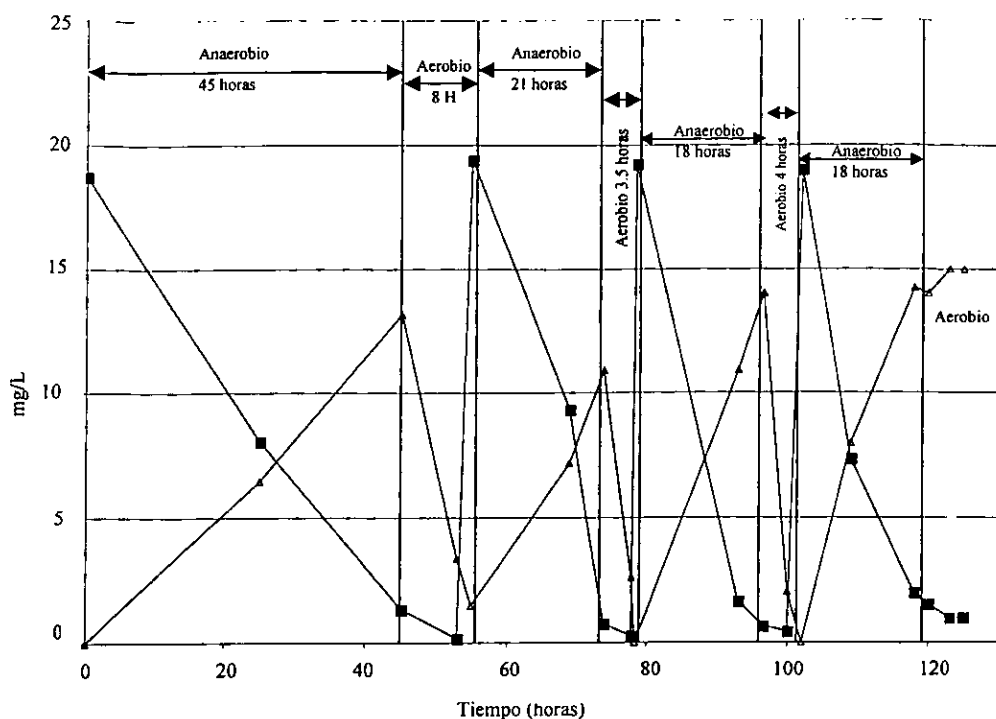


Figura III. 1.1 Operación tipo fed-batch (■ p-nitrofenol; ▲ p-aminofenol)

Discusión de los resultados

Observaciones principales:

Se confirma que en la etapa anaerobia las bacterias reducen el nitrofenol a aminofenol.

Este desaparece de el cultivo al pasar a la etapa aerobia por el metabolismo bacteriano, pero hay pérdida de actividad y destrucción de los flóculos después de tres ciclos, a pesar que la reducción de los tiempos del ciclo total parecía indicar la aclimatación de la población bacteriana.

Discusión: A pesar de la gran velocidad de reducción en la etapa anaerobia debido a la temperatura de operación, la mayor temperatura así como la no-renovación del volumen de líquido provoca la acumulación de compuestos (posiblemente de tipo húmico) que resultan tóxicos para los microorganismos y terminan por hacer que estos pierdan su actividad y dejen de flocular.

III.2 Operación con tiempos anaerobio-aerobio fijos

III.2.1 Evolución de la eficiencia global

La figura III.2.1 muestra la eficiencia en términos de desaparición de PNF en el efluente del reactor. Al cabo de 18 días a partir del arranque el efluente sale prácticamente sin nitrofenol, lo que es señal de la aclimatación de los microorganismos a la sustancia .

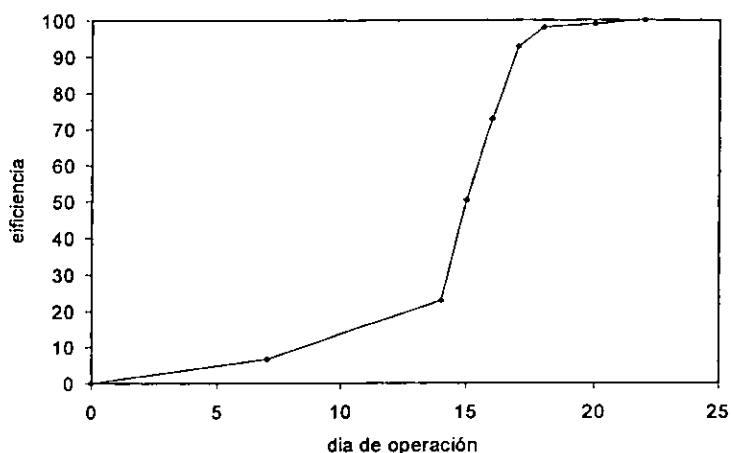


Figura III.2.1 Eficiencia del reactor en términos de paranitrofenol

III.2.2 Espectros de absorción en distintas etapas de la reacción

En la figura III.2.2 se representan los barridos uv-visible de estándares de aminofenol y nitrofenol, y en la figura III.2.3 las del tanque de alimentación, inicio de ciclo, fin de etapa anaerobia y fin de etapa aerobia. Se observa en la figura III.2.3 que la distribución de picos de absorción no cambia significativamente entre el inicio de reacción y el fin de etapa anaerobia lo que indica que no se produce aminofenol al final de la etapa anaerobia contrariamente a lo esperado y a lo ocurrido en el experimento tipo fed-batch.

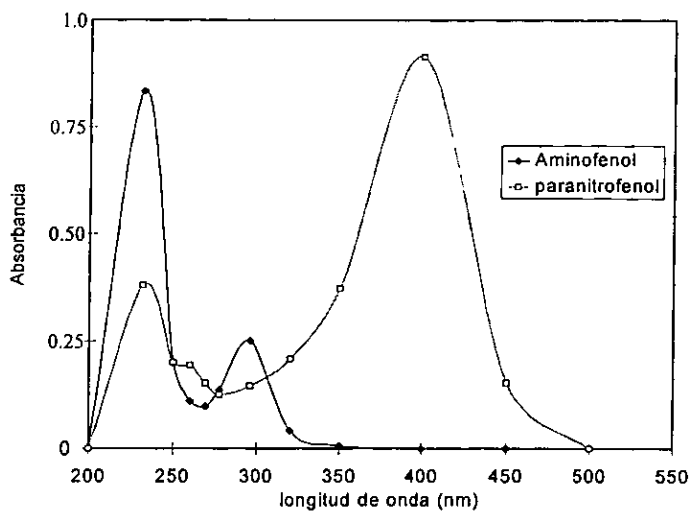


Figura III.2.2 Barridos UV de estándares de paranitrofenol y aminofenol

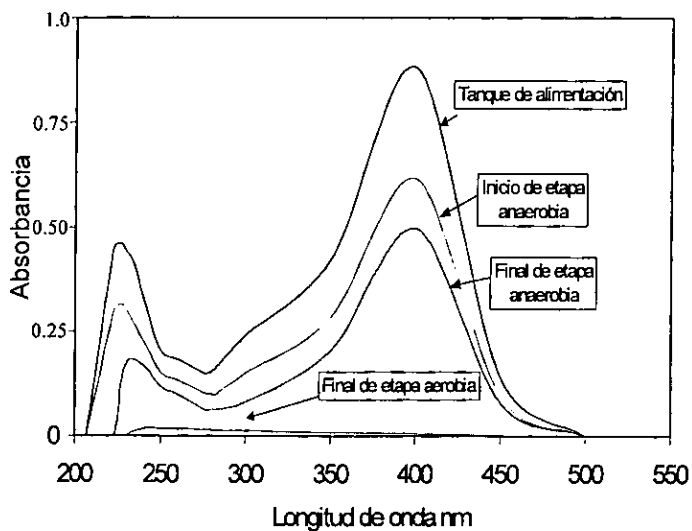


Figura III.2.3 Barridos uv-visible en varias etapas de operación

III.2.3 Seguimiento de la concentración de PNF en el tiempo

La figura III.2.4 muestra la evolución de la concentración de PNF en función del tiempo de reacción. Es claro que el descenso de PNF es mas rápido en la etapa aerobia que en la anaerobia.

Para descartar factores abióticos se corrió un control el cual fue aerado durante 5 horas. La concentración de PNF en el control al inicio fue de 23 mg/l y no presentó más cambios que un aumento pequeño debido probablemente al arrastre de agua por la corriente de aire (23.2 mg/l al final del experimento).

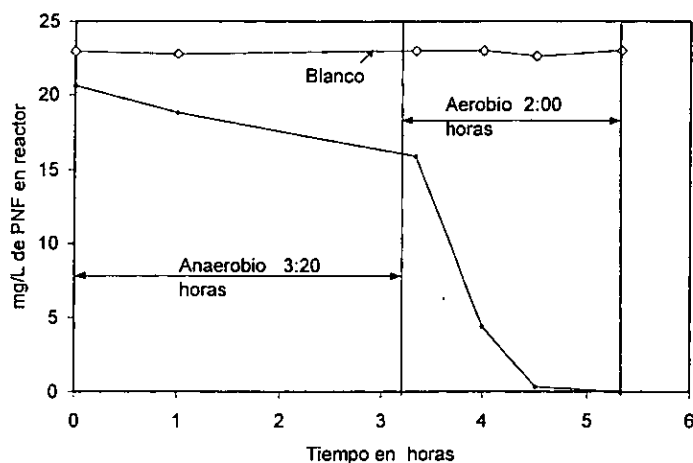


Figura III.2.4 . Cinética de desaparición del paranitrofenol

III.2.4 Valores del Carbono orgánico total (TOC)

El TOC fue medido al inicio del ciclo, final de anaerobio y final de aerobio, La figura III.2.5 muestra los resultados de las mediciones. Se nota una disminución en la concentración de carbono orgánico en el agua, lo que indica que el paranitrofenol esta siendo removido realmente y no solo transformado a otra sustancia.

Nuevamente la disminución de TOC es más veloz en la etapa aerobia de la operación que en la anaerobia.

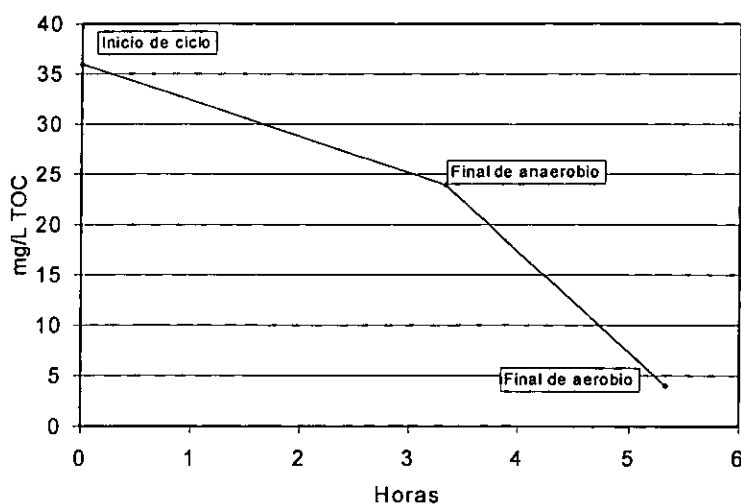


Figura III.2.5. Valores del carbono orgánico total (TOC) en distintas etapas de operación

III.2.5 Valores del potencial de oxidoreducción (E) y del oxígeno disuelto a lo largo de la reacción

Se midieron el nivel de oxígeno disuelto así como los valores del potencial de oxidoreducción del reactor a lo largo del ciclo (Figura III.2.6). Ellos muestran que si bien el nivel de oxígeno con rapidez tiende a cero, el potencial de reducción no caía a valores negativos, por lo que no se tienen condiciones reductoras que propicien la formación de paraminofenol.

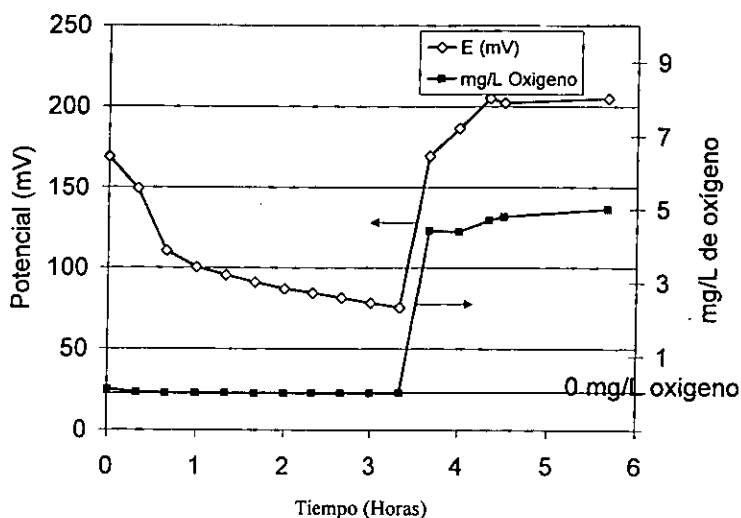


Figura III.2.6 . Valores de potencial de óxido reducción (E) y de oxígeno disuelto a lo largo de la reacción.

III.2.6 Tiempo requerido para la aparición de aminos en condiciones anaerobias con el licor mezclado del reactor de tiempos fijos

III.2.6.1 Descripción del experimento

Para investigar de forma más controlada la disminución del PNF durante las etapas anaerobias, un cierto volumen del licor mezclado (250mL) fue extraído y colocados en un recipiente perfectamente cerrado y se dejó el tiempo necesario para que el paranitrofenol desapareciera. Se mantuvo agitado el recipiente y se midieron las aminos y el paranitrofenol.

III.2.6.2 Resultados

Se observó que la producción de aminos por parte de los microorganismos es muy pequeña y es detectable a partir de 5 horas de iniciado el contacto con PNF (aparecen aproximadamente 1.5 mg/l de aminos a este tiempo). Dado que los periodos anaerobios usados eran solo de 3.5 horas se concluyó que a los microorganismos les hacía falta tiempo para empezar a comportarse en forma reductora y producir aminos. Estas son consumidas por la población hacia el final de la etapa anaerobia. (Figura III.2.7)

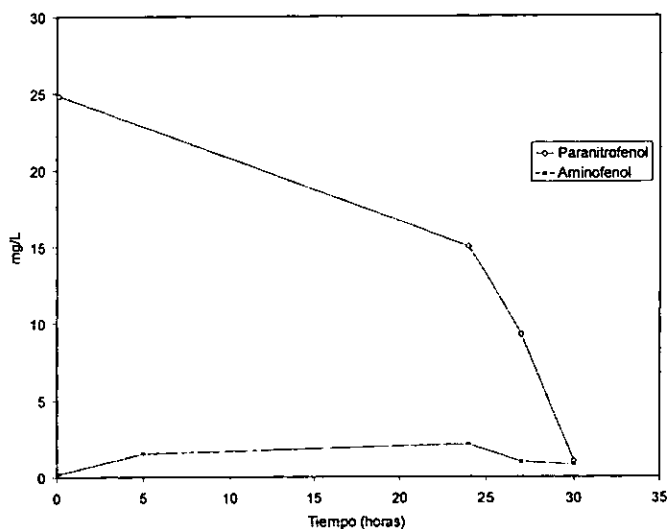


Figura III.2.7. Experimento adicional con etapa anaerobia larga.

Discusión de los resultados

Observaciones principales:

No hay producción de aminas en ningún momento durante la reacción, los barridos uv-visible no muestran la presencia de ningún compuesto diferente al para-nitrofenol.

Las mediciones de carbono orgánico indican que los microorganismos están consumiendo el compuesto, hay un efecto muy grande de aclimatación de la población bacteriana.

Discusión:

Este tipo de arranque parece haber generado una población de bacterias aerobias muy activas hacia el nitrofenol que resisten el tiempo de anaerobiosis sin necesidad de reducir el grupo nitro, es decir, sin necesidad de presentar un metabolismo anaerobio.

Los valores de potencial de óxido-reducción confirman que no se alcanzan nunca condiciones reductoras en este tipo de operación y la aclimatación de la población termina por seleccionar bacterias que degradan el para nitrofenol por vías aerobias.

Sin negar la importancia de degradar el nitrofenol de modo aerobio, este resultado ya se había obtenido en muchos otros lados (Spain, 1995) y para nuestros fines solo descarta la posibilidad de intentar un arranque con tiempos fijos si se quiere investigar un método que genere una comunidad que en la etapa anaerobia actúe como anaerobia (reduzca el nitrofenol) y en la aerobia actúe con un metabolismo oxidativo (consume el carbono hacia CO₂).

III.3 Operación a eficiencias constantes en modo SBR

III.3.1 Evolución de las concentraciones molares de paranitrofenol y aminofenol en varios ciclos de operación

La figura III.3.1 muestra las concentraciones en molaridad de paranitrofenol y aminofenol para varias corridas del reactor. Se observa que con esta manera de operar existe una efectiva transformación de PNF a PAF.

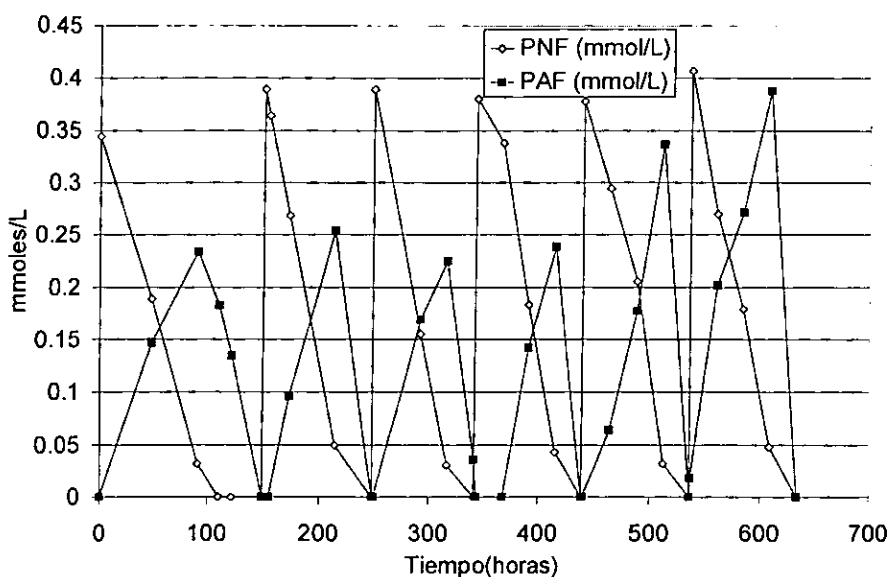


Figura III.3.1. Concentraciones molares de paranitrofenol y para-aminofenol en varias corridas

Como la reacción de paranitrofenol a aminofenol es uno a uno, la expresión en cantidades molares permite comparar que tan cuantitativamente está el nitrofenol biotransformándose a aminas. La relación entre (cantidad de aminas producidas)/(cantidad de aminas esperadas por estequiometría) se muestra en la figura III.3.2.

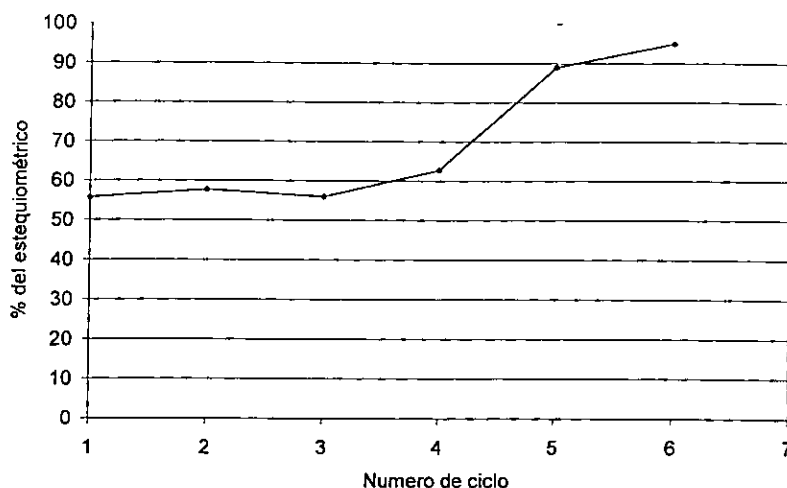


Figura III.3.2 Comparación de aminas observadas contra aminas esperadas como porcentaje.

De esta gráfica es evidente que aunque en el principio el paranitrofenol no se transformaba a aminas ni siquiera en un 60%, con cada ciclo consecutivo la biotransformación va siendo más cuantitativa, hasta llegar a una valor de casi 95 %.

III.3.2 Espectros de absorción UV-visible en varias etapas de un ciclo

Los barridos UV del efluente del anaerobio y aerobio se muestran en la gráfica III.3.3.

En la misma gráfica se han incluido los espectros uv-visible de estándares de aminofenol y paranitrofenol. Comparando las curvas de final de etapa anaerobia y de inicio de ciclo con las curvas de los estándares puede constatar que el para-nitrofenol sufre una transformación hacia aminofenol, pues la curva del final de anaerobio muestra los picos característicos de este último (máximos de absorbancia a 280 nm y 220 nm).

El final de la etapa aerobia no muestra picos característicos de absorbancia a 220 nm , lo que indica que al final de la etapa aerobia no hay anillos bencénicos, que se caracterizan por absorber a estas longitudes de onda.

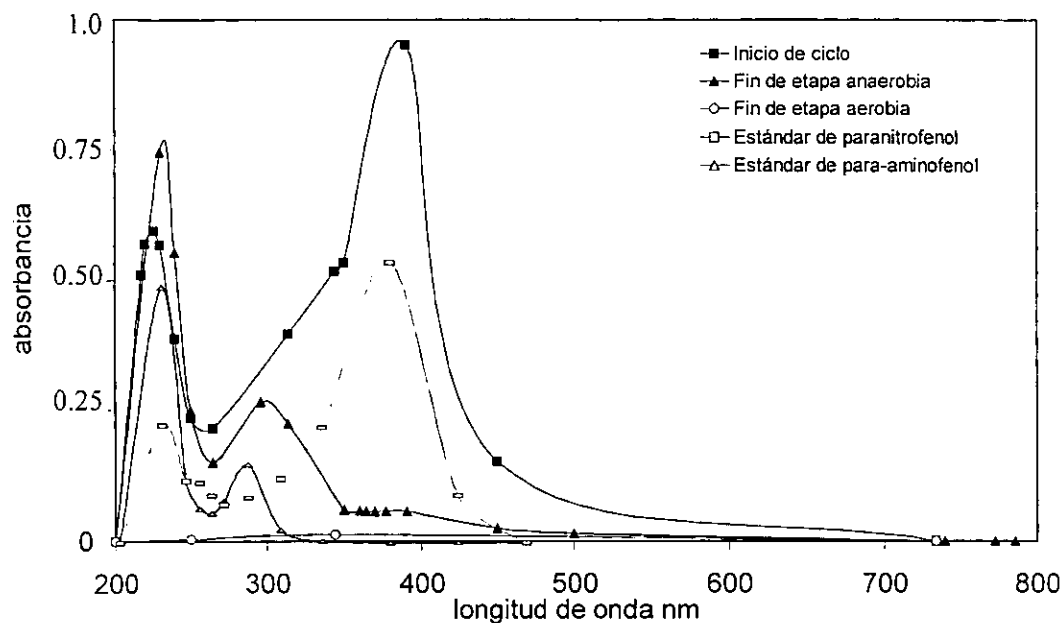


Figura III.3.3 Barridos uv-visible en varias etapas de un ciclo.

III.3.3 Evolución de los tiempos totales de reacción

La figura III.3.4 muestra los tiempos de reacción para ciclo completo. De ella puede concluirse que, con excepción del primer ciclo donde los tiempos baja de 146 a 96 horas, dichos tiempos son muy similares uno con otro y no bajan a menos de 3 días en los ciclos manejados. Esto puede deberse a que la temperatura de 28°C no acelera la aclimatación de los microorganismos en la etapa anaerobia.

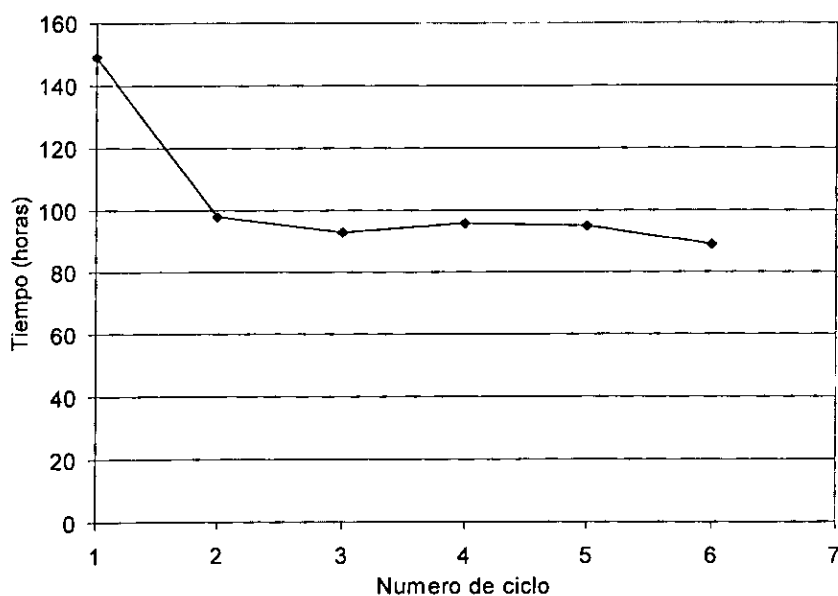


Figura III.3.4 Tiempo total de reacción vs número de ciclo

III.3.4 Evolución de las velocidades de reducción del PNF en la etapa anaerobia y de mineralización del PAF en la etapa aerobia. Efecto de aclimatación

La figura III.3.5 muestra las velocidades de conversión de PNF en la etapa anaerobia y las velocidades de consumo del PAP en la etapa aerobia. En ella se observa que si bien la velocidad a que se transformaba el PNP en las etapas anaerobias no varía grandemente, la de consumo de PAP si va aumentando consistentemente ciclo con ciclo, lo que confirma que a la temperatura trabajada se aclimatan más rápidamente las bacterias de metabolismo aerobio que las de anaerobio.

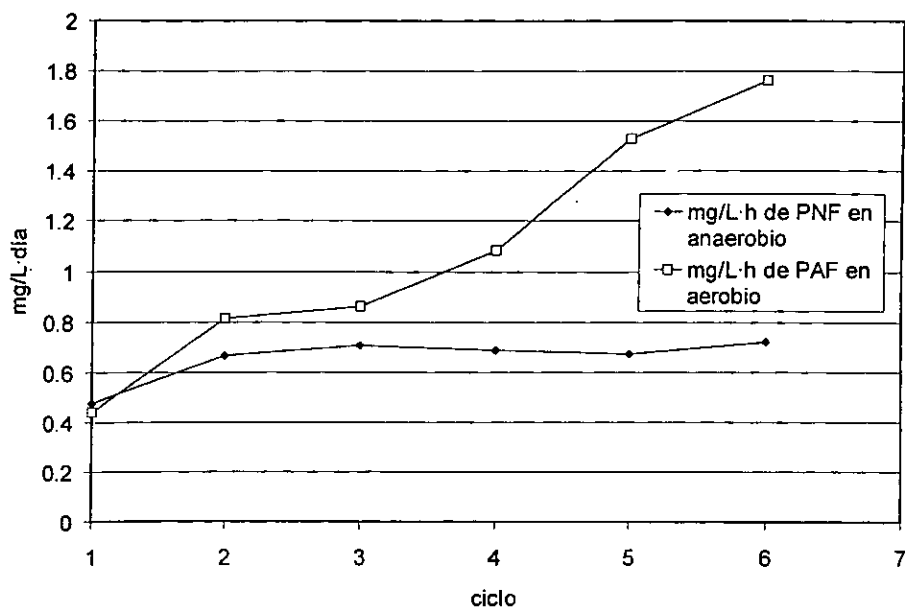


Figura III.3.5 Velocidades de consumo de PNF en la etapa anaerobia y de desaparición de PAF en la aerobia contra numero de ciclo

III.3.5 Determinación de Carbono orgánico total (TOC)

Dado la tendencia del aminofenol en autooxidarse, es importante saber si se cumple con el objetivo de disminuir el contenido orgánico del agua residual. Un perfil del carbono orgánico total de una corrida se muestra en la figura III.3.6

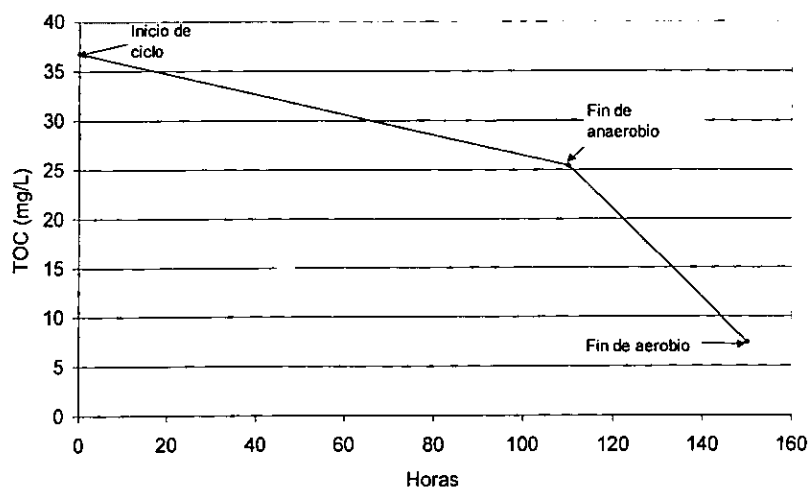


Figura III.3.6 Perfil de carbono orgánico total en varias etapas del ciclo.

El valor pequeño de carbono orgánico total obtenido al final del ciclo aerobio junto con los barridos UV mostrados arriba dan la base para afirmar que tanto el para-aminofenol formado así como cualquier otro producto de autooxidación que pudiera formarse ha sido mineralizado.

Una comparación de carbono orgánico total al principio de los ciclos contra el de la salida al final de la etapa aerobia se muestra en la figura III.3.7, así como una figura de % de remoción de carbono orgánico total (figura III.3.8).

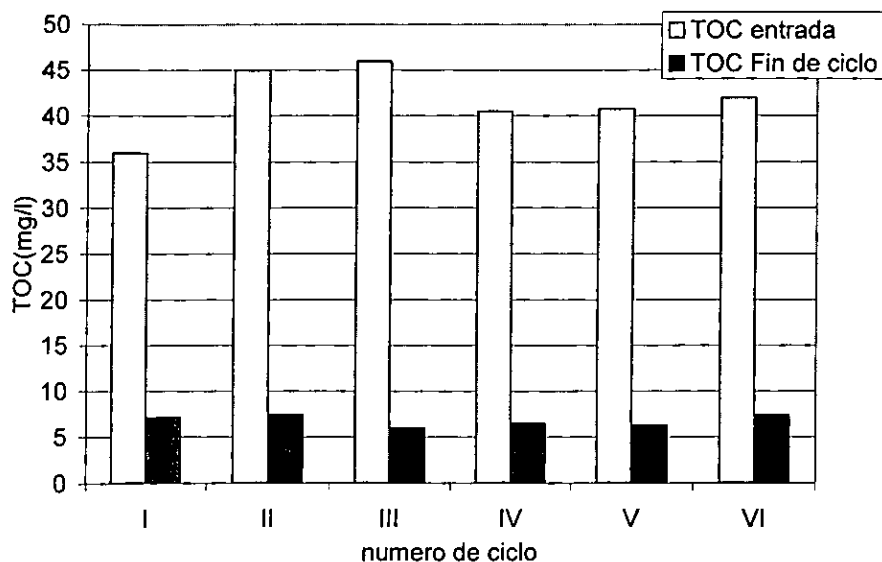


Figura III.3.7. Comparación de TOC de entrada con TOC de fin de ciclo para 6 ciclos de operación.

De ambas gráficas resulta claro el descenso efectivo de la cantidad de contenido orgánico del agua con remociones todas arriba de 80% de carbono orgánico total.

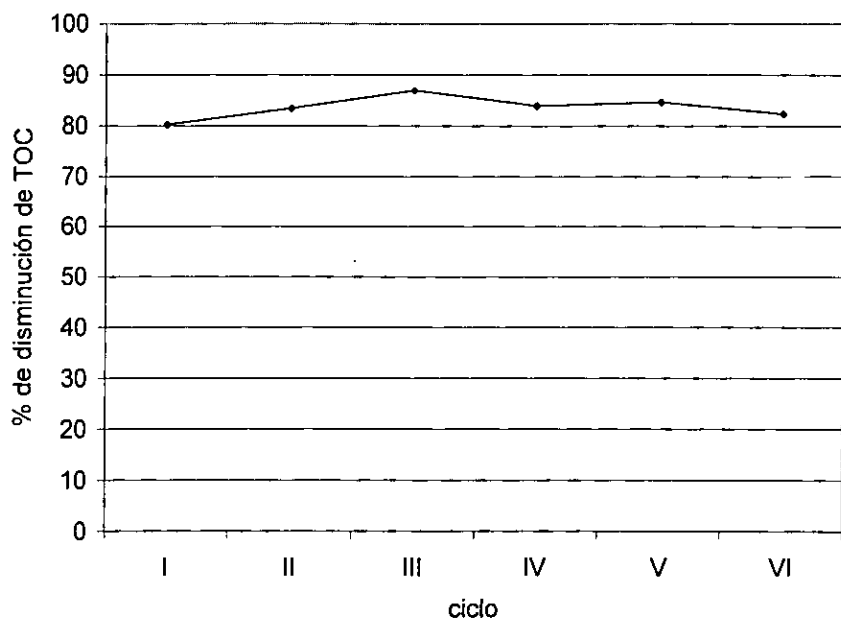


Figura III.3.8. Eficiencia de remoción de TOC como % del TOC de entrada.

III.3.6 Valores de potencial de oxido-reducción y de oxígeno disuelto

Los valores de potencial de oxidoreducción (E en mV) así como los de oxígeno disuelto en mg/l se muestran en la figura III.3.9.

En aproximadamente 4 horas el valor de potencial redox cambia de +23 mV luego de cargar a -44 mV y baja hasta los -250 mV en la etapa aerobia. Los valores de oxígeno disuelto son prácticamente cero a todo lo largo de la etapa. Para la etapa aerobia (que inicia en la hora 110 de reacción) el potencial de óxido reducción sube hasta los +80mV y el oxígeno libre ronda los 6.5 mg/l.

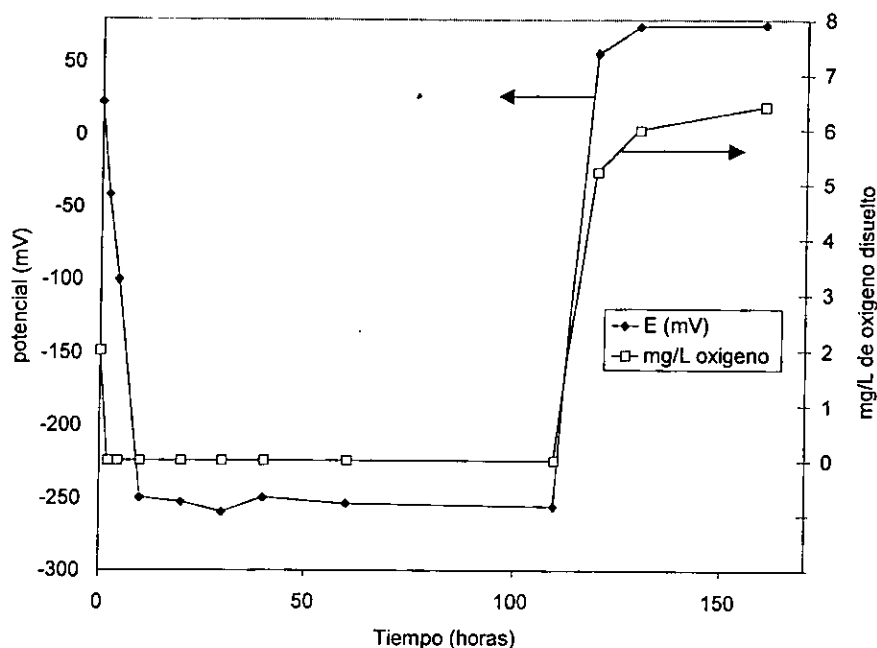


Figura III.3.9 Valores de potencial de oxido reducción y de oxígeno disuelto en un ciclo completo

III. 3.7 Comparación de la transformación de para-aminofenol con aire en presencia de bacterias y en ausencia de ellas

III. 3.7.1 Descripción

El aminofenol al ser aireado se autooxida hacia quinonas coloridas, que le dan un color pardo a la solución. Se compararon los barridos uv-visible de dos recipientes aireados, en uno de ellos se colocó biomasa con aminofenol y solución mineral, en otro solo aminofenol y solución mineral, pero sin biomasa. Este ultimo experimento sería un control de la etapa aerobia para comprobar que el aminofenol no está arrastrándose por el aire o transformándose en otra sustancia en la etapa aerobia .

III.3.7.2 Resultados

Los barridos uv-visible luego de un día de aeración se muestran en la figuras III.3.10 y III.3.11.

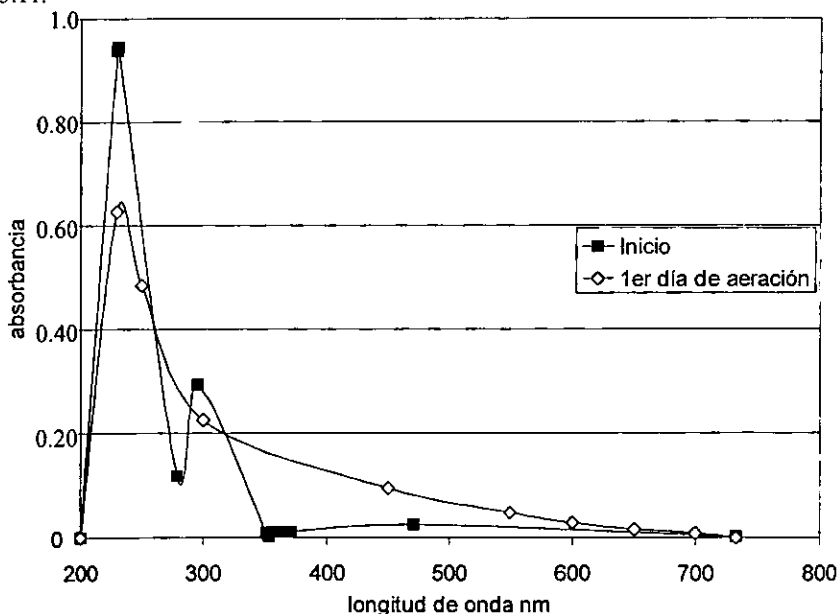


Figura III.3.10 Experimento sin biomasa

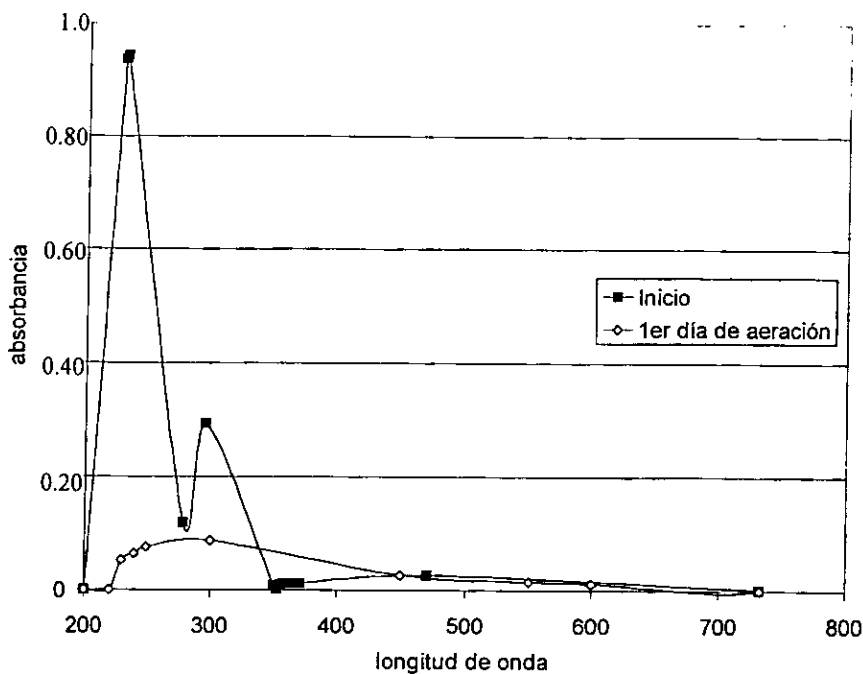


Figura III.3.11 Experimento con biomasa.

Entre las gráficas III.3.11 y III.3.10 se nota que en el experimento sin biomasa el pico del anillo aromático (alrededor de 220 nm) disminuye muy poco, contrariamente a lo que pasa en el experimento con biomasa, donde la absorción a esta longitud de onda baja mucho. Esto comprueba que las bacterias logran una desaromatización del compuesto que no sucede por medios abióticos.

Discusión de los resultados

Observaciones principales:

Se observó la aparición de aminas durante la etapa anaerobia del proceso. Las aminas desaparecen en la etapa aerobia y las mediciones de carbono orgánico confirman que el carbono está siendo removido del agua. Se consigue una operación estable, aunque no se alcanzan a ver (en los primeros tres ciclos de la operación) gran disminución en los tiempos de ciclo total.

Discusión: Este método de arranque cumple en cuanto a que la misma comunidad es obligada a operar en forma anaerobia y aerobia. Siendo la temperatura de 28°C en promedio, la operación anaerobia de las bacterias no puede mostrar la enorme velocidad de reducción de grupo nitro que se observó en la operación a 37°C, ni fueron visibles los efectos de aclimatación del metabolismo anaerobio entre ciclos (a no ser que se consideren del primero al segundo), sin embargo, los tiempos aerobios si se redujeron consistentemente entre ciclos mostrando una aclimatación de la comunidad hacia el ataque aerobio a las aminas. La cuantitividad en la producción de aminas si aumenta entre ciclos consecutivos.

El efluente se mantiene claro contrariamente a lo ocurrido en la operación tipo fed-batch, con lo que puede concluirse que no se alcanzan a producir los productos coloreados de la autooxidación de aminofenol.

Capítulo IV. Conclusiones

Entre las conclusiones más importantes a resaltar de la experimentación están:

1. Es posible obtener una misma comunidad que al encontrarse en condiciones anaerobias reduzca el nitrocompuesto y que al cambiar a condiciones de presencia de oxígeno use el compuesto reducido para obtener carbono y energía.
2. El modo de arranque de un reactor es determinante en la clase de bacterias que se seleccionan. Un modo de operación a tiempo fijo selecciona bacterias que no son capaces de reducir al compuesto en la anaerobiosis, por lo tanto hay que dar el tiempo que sea necesario de anaerobiosis hasta que se observe que las bacterias están reduciendo el compuesto, es decir, asegurar un potencial de óxido-reducción menor a los -200 mV.
3. Debido a la gran cantidad de interacciones del grupo nitro no es posible saber si las bacterias lo están usando como pozo final de electrones (respirándolo) o si su reducción está siendo provocada en reacciones menos específicas.

Bibliografía

- 1.- APHA/AWWA (1995) "Standard methods for the examination of water and waste water" 19th ed. Water Environment Federation, Washington DC, USA.
- 2.-Blasco R. and F. Castillo. (1992) "Light-dependent degradation of nitrophenols by the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1" *Applied and environmental Microbiology* Vol(58) 2, 690-695
- 3.-Boyd S.A., D.R. Shelton, D. Berry and J.M. Tiedje (1983) "Anaerobic biodegradation of phenolic compounds in digested sludge". *Applied and environmental Microbiology*. Vol(46) 1, 50-54.
- 4.-Bruhn C., H. Lenke and H.-J. Knankmuss (1987) "Nitrosubstituted aromatic compounds as nitrogen source for bacteria" *Applied and environmental Microbiology* Vol(53) 1, 208-210
- 5.-Cha J.A., K.B. Berry and P.K. Lim (1986) "Aerobic coupling of aqueous phenols catalyzed by binuclear copper: Ring substituent effect and the kinetics of the coupling of o-methylphenol" *AIChE Journal*. Vol(32) 3, 477-485
- 6.-Delgado A., M.G. Wubbolts, M.-A. Abril and J.L. Ramos (1992) "nitroaromatics are substrates for the TOL plasmid Upper-pathway enzymes" *Applied and environmental Microbiology* Vol(58) 1, 415-417
- 7.- Dickel O. and Knackmuss H.-J. (1991) "Catabolism of 1,3-dinitrobenzene by *Rhodococcus* sp. QT-1" *Archives of Microbiology* 157: 76-79
- 8.-Donlon B.A., E. Razo-Flores, G. Lettinga and J. Field (1996) "Continuous detoxification, transformation and degradation of nitrophenols in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors" *Biotechnology and Bioengineering* Vol(51) 4, 439-449
- 9.-Duong M.H., S.L. Penrod and S.B. Grant (1997) "Kinetics of p-nitrophenol degradation by *Pseudomonas* sp.:An experiment illustrating bioremediation". *Journal of Chemical Education* Vol(74) 12, 1451-1454
- 10.-Gorontzy T., J. Küver y K. Blotvogel. (1993) . "Microbial transformation of nitroaromatic compounds under anaerobic conditions". *Journal of General Microbiology* 139, 1331-1336.

- 11.-Hallas L.E. and M. Alexander (1983) "Microbial transformations of nitroaromatic compounds in sewage effluent". *Applied and environmental Microbiology* Vol(45) 4, 1234-1241
- 12.-Heitkamp M.A., V. Camel, T.J. Reuter and W.J. Adams (1990) "Biodegradation of p-nitrophenol in an aqueous waste stream by immobilized bacteria". *Applied and environmental Microbiology*. Vol (56) 10, 2967-2973.
- 13.-Jain R.K., J.H. Dreisbach and J.C. Spain (1994) "Biodegradation of p-nitrophenol via 1,2,3-benzenetriol by an *Anthrobacter* sp." *Applied and environmental Microbiology* Vol(60) 8, 3030-3032
- 14.-Kadilaya V. and J.C. Spain (1998) "A two-component Monooxygenase catalyses both the hydroxilation of p-nitrophenol and the oxidative release of nitrite from 4-nitrocatechol in *Bacillus sphaericus* JS905" . *Applied and environmental Microbiology* Vol(64) 7, 2479-2484.
- 15.- Lenke H. and Knackmuss H-J. (1992) "Initial hydrogenation during catabolism of picric acid by *Rhodococcus erythropolis* HI 24-2". *Applied and environmental Microbiology* Vol (58) 6, 2928-2932.
- 16.-Marvin-Sikkema F.D. and J.A.M. de Bont (1994) "Degradation of nitroaromatic compounds by microorganisms" *Applied Microbiology and biotechnology* 42, 499-507
- 17.- McCormick N.G., Feeherry F.F. and Levinson H.S. (1978) "Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene and other nitroaromatic compounds" *Applied and environmental Microbiology* (31) 2, 949-958.
- 18.-Nishino S.F. and J.C. Spain. (1993) "Cell density-dependent adaptation of *Pseudomonas putida* to biodegradation of p-nitrophenol" *Environ. Sci. Technol.* Vol(27) 3, 489-494
- 19.-Oren A., P. Gurevich and Y.Henis (1991) "reduction of nitrosubstituted aromatic compounds by the halophilic anaerobic eubacteria *Haloanaerobium praevalens* and *Sporohalobacter marismortui*". *Applied and environmental Microbiology*. Vol(57) 11, 3367-3370.
- 20.-Roldán M.D., R.Blasco, F.J. Caballero and F. Castillo (1998) "Degradation of p-nitrophenol by the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*" *Arch. Microbiol.* 169 , 36-42
- 21.-Schenzle A., H. Lenke, P. Fischer, P.A. Williams and H. Knackmuss (1997) "Catabolism of 3-nitrophenol by *Ralstonia eutropha* JMP 134" *Applied and environmental Microbiology*. Vol(63) 4, 1421-1427.
- 22.-Schmidt S.K., K.M. Scow and M. Alexander (1987) "Kinetics of p-nitrophenol mineralization by a *Pseudomonas* sp.:Effects of second substrates" *Applied and environmental Microbiology* Vol(53) 11, 2617-2623

- 23.-Schwarzenbach R.P., R. Stierli, B.F. Folsom, and J.Zeyer (1988) "Compounds properties relevant for assessing the environmental partitioning of nitrofenols" *Environ. Sci Technol.* Vol(22)1, 83-92.
- 24.-Spain J.C. (1995) "Biodegradation of nitroaromatic compounds" *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 523-555
- 25.-Spain J.C. and D.T. Gibson (1991) " Pathway for biodegradation of p-nitrophenol in a *Moraxella* sp." *Applied and enviromental Microbiology* Vol(57) 3, 812-819
- 26.-Spain J.C., P.H. Pritchard and A.W. Bourquin. (1980) "Effects of adaptation on biodegradation rates in Sediment/Water cores from estuarine and freshwater environments" *Applied and enviromental Microbiology.* Vol(40) 4, 726-734
- 27.-Spain J.C. and P.A Van Veld (1983) "Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: effects of concentration, exposure time, inoculum and chemical structure" *Applied and enviromental Microbiology* Vol(45) 2, 428-435.
- 28.-Spain J.C., P.A Van Veld, C.A. Monti, P.H. Pritchard, and C.R. Cripe. (1994) "Comparison of p-Nitrofenol Biodegradation in field and Laboratory Test Systems" *Applied and environmental Microbiology.* Vol (48) 5, 944-950
- 29.-Takenaka S., S. Murakami, R. Shinke and K. Aoki. (1998) "Metabolism of 2-amoniphenol by *Pseudomonas* sp. AP-3: modified meta-cleavage pathway" *Arch Microbiol* .170, 132-137.
- 30.-Takenaka S., S.Murakami, R. Shinke, K. Hatakeyama, H. Yukawa and K. Aoki. (1997) "Novel genes encoding 2-aminophenol 1,6-dioxigenase from *Pseudomonas* Species AP-3 growing on 2-aminophenol and catalytic properties of the purified enzyme". *The journal of biological chemistry.* Vol(272) 23, 14727-14732
- 31.-Uberoi V. and S.K. Bhattacharya (1997) "Toxicity and degradability of nitrophenols in anaerobic systems". *Water Environmental Research.* Vol(69) 2, 146-156.
- 32.- Valli K., Brock B.J., Joshi D.K. and Gold M.H. (1992) "Degrdaton of 2,4-dinitrotoluene by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*" *Applied and enviromental Microbiology* (58) 1, 221-228.
- 33.-Xu Y, G. Huang and Y. Yu. (1995) "Kinetics of phenolic polimerization catalyzed by peroxidase in organic media" *Biothecnology and bioengineering Applied and enviromental Microbiology* Vol(47) 1, 117-119
- 34.-Zaidi B.R. and S.H. Imam. (1996) "Inoculation of microorganism to enhance biodegradation of phenolic compounds in industrial wastewater: isolation and identification of three-indigenous bacetrial strains" *J. Gen. Appl. Microbiol.* Vol(42) 249-256.

- 35.-Zaidi B.R., Y. Murakami and M. Alexander (1988) "Factors limiting succes of inoculation to enhance biodegradation of low concentration of organic chemicals" *Environ. Sci. Technol.* Vol(22) 12, 1419-1425
- 36.-Zeyer J. and P. Kearney (1984) "Degradation of o-nitrophenol and m-nitrophenol by a *Pseudomonas putida*". *Journal of agricultural and food Chemistry.* Vol(32) 2. 238-242.
- 37.-Zeyer J., H.P. Kocher and K.N. Timmis (1986) "Influence of para-substituents on the oxidative metabolism of o-nitrophenol by *Pseudomonas putida* B2" *Applied and enviromental Microbiology* Vol(52) 2, 334-339
- 38.- Zitomer D.H. and Speece R.E. (1993). "Sequential environments for enhanced biotransformations of aqueous contaminants" *Environmental Science and Technology.* (27) 2, 227-244