



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS

BIOAUMENTACIÓN DE LODOS ANAEROBIOS PARA LA
DEGRADACIÓN DE ALQUIL BENCEN SULFONATO LINEAL

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

BIÓL. OSCAR RICARDO GARCÍA RUBIO



TUTOR: DR. OSCAR MONROY HERMOSILLO

AÑO: 2006



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:	Dr. Edgardo Escamilla Marván
Vocal:	Dr. Javier Plasencia de la Parra
Secretaria:	Dra. Gloria Soberón Chávez
Suplente:	Dr. Guillermo Aguilar Osorio
Suplente:	Dr. Víctor Manuel Luna Pabello

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Biotecnología, CBS, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Dr. Óscar Monroy Hermosillo

Asesor

Biól. Oscar Ricardo García Rubio

Sustentante

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Oscar Monroy Hermosillo**, director de esta tesis, por la asesoría que me brindó durante mi desarrollo académico y por su apoyo para la realización de este trabajo.

A la **Dra. Gloria Soberón Chávez**, quien me facilitó la cepa bacteriana empleada en este trabajo. Además de sus atinados comentarios en el desarrollo de la investigación y de la escritura de la tesis.

Al **Dr. Ilangovan Kuppusamy**, por sus atinadas observaciones a este trabajo.

Al **Dr. Jesús García Campos**, por su asistencia técnica para el cultivo de la bacteria empleada y sus aportaciones al desarrollo de este trabajo.

A la **Dra. Florina Ramírez Vives**, por su valiosa ayuda en la enseñanza de las técnicas de laboratorio, específicamente en las del cultivo de microorganismos extremófilos.

A la **Dra. Mónica Meraz Rodríguez**, por sus comentarios a esta investigación.

A la **M. en C. Carmen Fajardo Ortiz**, por su ayuda en el manejo del equipo de cromatografía de gases acoplado a masas.

A los Drs. **Edgardo Escamilla Marván, Javier Plasencia de la Parra, Guillermo Aguilar Osorio y Víctor Manuel Luna Pabello**, por sus comentarios y aportaciones a mi trabajo.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por la beca-crédito que me asignó para la realización de mis estudios de Maestría.

DEDICATORIAS

Siempre que inicio algún proyecto, mis padres no dudan en que lo llevaré a buen puerto, por ello les tengo dedicar parte de esta tesis. Gracias por todo lo que me ayudan y me apoyan.

Con cariño, a **Tere y Ricardo**.

Desde que decidimos caminar esta jornada juntos, me has enseñado a vivir con mucha alegría y a disfrutar de tantas cosas que había ignorado; por ello, te agradezco infinitamente. Pero además, tengo que darte las gracias por permitirme ausentarme (a veces físicamente) para realizar tantos proyectos. He aquí, la conclusión de uno más...

Con todo mi amor, a **Gaby**

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	VII
VARIABLES Y PARÁMETROS.....	VIII
RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 ANTECEDENTES.....	1
1.2 SISTEMA DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.....	5
1.2.1 Reactor de lecho de lodos anaerobios de flujo ascendente (UASB).....	5
1.2.2 Reactor UASB en dos etapas.....	6
1.3 MICROBIOLOGÍA DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA.....	6
1.3.1 Etapas de la digestión anaerobia.....	7
1.3.1.1 Etapa I. Hidrólisis y fermentación.....	7
1.3.1.2 Etapa II. Acetogénesis.....	8
1.3.1.3 Etapa III. Metanogénesis.....	9
1.4 TENSOACTIVOS.....	11
1.4.1 Naturaleza de los tensoactivos.....	11
1.4.2 Síntesis de los tensoactivos y su clasificación.....	12
1.4.3 Degradación de los tensoactivos del tipo LAS.....	14
1.4.3.1 Vías metabólicas para la biodegradación del LAS.....	16
1.4.3.1.1 Degradación de la cadena alquílica: ω -oxidación.....	17
1.4.3.1.2 Degradación de la cadena alquílica: β -oxidación.....	18
1.4.3.1.3 Degradación del grupo bencen sulfonato.....	20
1.4.3.1.4 Desulfonación.....	22
1.4.4 Toxicidad de los tensoactivos del tipo LAS.....	24
1.5 DESNITRIFICACIÓN.....	25
1.5.1 Regulación de la desnitrificación por el oxígeno.....	26
1.5.2 Metabolismo de compuestos xenobióticos por bacterias desnitrificantes.....	28

1.5.3 Diversidad de las bacterias desnitrificantes.....	30
1.6 BIOAUMENTAR PARA BIOREMEDIAR.....	31
1.6.1 Estrategias de bioaumentación para la degradación de xenobióticos.....	32
1.6.2 Efectos de los factores bióticos y abióticos sobre el inóculo.....	34
1.6.3 Bioaumentación con microorganismos no-nativos.....	36
2 HIPÓTESIS.....	39
3 OBJETIVOS.....	40
3.1 Objetivo general.....	40
3.2 Objetivos particulares.....	40
4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
4.1 REACTIVOS QUÍMICOS.....	41
4.2 CEPA BACTERIANA.....	41
4.3 CONDICIONES DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE LA CEPA M113 Y DETERMINACIÓN DE SU BIOMASA.....	41
4.4 REACTORES DE LECHO DE LODOS CON FLUJO ASCENDENTE (UASB).....	42
4.5 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN EN PLACA DE LA CEPA M113.....	43
4.6 DETERMINACIÓN DEL ALQUIL BENZEN SULFONATO (LAS).....	44
4.6.1 Cuantificación del LAS en los lodos.....	44
4.7 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES POR FENOL – SULFÚRICO.....	44
4.8 DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO (DQO).....	45
4.9 CUANTIFICACIÓN DE NO ₃ ⁻ Y NO ₂ ⁻	45
4.10 CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A MASAS.....	45
4.11 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	46
4.12 CÁLCULOS ESTEQUIOMÉTRICOS PARA LA ADICIÓN DE NO ₃ ⁻	46
4.13 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS.....	47
5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
5.1 CRECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE LA CEPA M113 CON DIFERENTES SUSTRATOS.....	48
5.2 DISMINUCIÓN APARENTE DE LA BIOMASA DE LA CEPA M113.....	53

5.3 PRODUCTOS DE LA DEGRADACIÓN DEL LAS POR LA CEPA M113.....	57
5.4 BIOAUMENTACIÓN DEL RA CON LA CEPA M113.....	60
5.4.1 Integración de la cepa M113 a los lodos del reactor acidogénico.....	60
5.4.2 Remoción de la DQO y del LAS.	65
5.5 ADICIÓN DE NO_3^- AL SISTEMA DE DOS ETAPAS.....	68
6 CONCLUSIONES	73
7 REFERENCIAS	76
8 ANEXOS	86
ANEXO I.....	86
ANEXO II.....	87
ANEXO III.....	89

ABREVIATURAS

Acetil CoA = acetil coenzima A

AGV = ácidos grasos volátiles

ATP = adenosín trifosfato

BAS = dodecil bencen sulfonato ramificado

BSR = bacterias sulfato reductoras

CG/MS = cromatografía de gases acoplada a masas

CL₅₀ = concentración letal media

Cm = cloramfenicol

CoA = coenzima a

DQO = demanda química de oxígeno

e.g. = *exempli gratia* (por ejemplo)

Ec. = ecuación

Ester CoA = ester coenzima A

LAS = alquil sulfonato linear

OHPA = bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno

OM = otros microorganismos

RA = reactor acidogénico

RedOx = reacciones de óxido reducción

RM = reactor metanogénico

RPM = revoluciones por minuto

SAAM = sustancias activas al azul de metileno

SDS = dodecil sulfato de sodio

SV = sólidos volátiles

TRH = tiempo de retención hidráulica

TRS = tiempo de retención de sólidos

UASB = reactor de lecho de lodos anaerobios de flujo ascendente

UFC = unidades formadoras de colonias

VARIABLES Y PARÁMETROS

° C = grados centígrados

CL₅₀ = concentración letal media

cm = centímetros

d = día

DL₅₀ = dosis letal media

E° = entropía

g = gramos

g = fuerza gravitacional

h = horas

Kg = kilogramos

KJ = kilojoules

KV = kilovoltios

L = litro

M = molar

mg = miligramos

min = minutos

mL = mililitro

mm d. i. = milímetros de diámetro interno

mV = milivoltios

m³ = metro cúbico

nm = nanómetros

pH = -log [H⁺]

s = segundos

S = sustrato en el punto máximo de crecimiento

S₀ = sustrato inicial

Torr = unidades de presión (1/760 de una atmósfera, 133.3 Pascales)

V = volts

X = biomasa en el punto máximo de crecimiento

X_0 = biomasa inicial

Y = coeficiente específico de crecimiento

δ = tasa de muerte celular

ΔG = energía libre de estándar a 25°C (°) de reacción (KJ/equivalente)

μ = velocidad específica de crecimiento

μA = microamperios

μg = microgramos

μm = micrómetros

RESUMEN

Los tensoactivos alquil bencen sulfonato de sodio (LAS) son ampliamente empleados en la industria. En plantas de tratamiento de aguas residuales (a $>$ [30 mg/L]) ocasionan la disminución de la eficiencia de remoción de materia orgánica. A mayores concentraciones, su alta toxicidad ocasiona problemas ambientales. Con la finalidad de tratar efluentes con concentraciones de LAS de 300 mg/L se instaló un reactor de lecho de lodos anaerobios de flujo ascendente (UASB) en dos etapas (acidogénica y metanogénica), que se bioaugmentó con una *Pseudomonas aeruginosa* (M113). Esta bacteria tiene la capacidad de emplear al LAS como única fuente de carbono. *In vitro*, la cepa degradó un 80% de 300 mg/L de LAS bajo condiciones anóxicas (con NO_3^- como aceptor de electrones). Adicionalmente la bacteria sintetizó un exopolímero que le ayuda a integrarse a los gránulos de los lodos acidogénicos. Esta sustancia es un derivado del dodecatrienol que junto con el ácido bencendicarboxílico son las moléculas resultantes de la escisión del LAS hecha por la cepa M113. Después de inocular a la cepa M113 en el reactor acidogénico (4.6×10^8 UFC/mL), se realizó una corrida, en ausencia de NO_3^- , y adicionando 300 mg/L de LAS; se registró una remoción del 66% del LAS, pero ambos reactores acumularon una concentración de 1.52 mg LAS/g SV, lo que disminuyó el rendimiento de eliminación de la DQO al 60% en el RA, e inhibió la metanogénesis en el RM. En un segundo experimento se adicionó NO_3^- en el medio de alimentación para promover la degradación del LAS, y se encontró que el porcentaje de degradación aumentó a 73% en el reactor acidogénico, mientras que en el reactor metanogénico no ocurrió degradación. A pesar de que la acumulación de LAS en los lodos fue menor (0.84 mg LAS/g SV), en ambos reactores disminuyó sensiblemente la remoción de la DQO que fluctuó alrededor de un 50%.

ABSTRACT

Linear sodium alkylbenzenesulfonates (LAS) are widely used in many industries. At wastewater treatment plants (a > [30 mg/L]) they decrease the efficiency to remove organic matter. At greater concentrations, their high toxicity causes environmental problems. An Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) in two stages (acidogenic and methanogenic) bioaugmented with *Pseudomonas aeruginosa* (M113) was installed to treat effluents with LAS concentrations of 300 mg/L. This bacterium has the ability to use LAS as its only source of carbon. *In vitro*, this strain degraded 80% of 300 mg/L LAS under anoxic conditions (using NO_3^- as electron acceptor). Additionally the bacterium synthesized an exopolymer that facilitates its inclusion to the acidogenic granular sludge. This substance is a byproduct of dodecatrienol which in conjunction with benzenedicarboxylic acid are the resultant molecules of the excision of LAS performed by strain M113. After inoculating strain M113 into the acidogenic reactor (4.6×10^8 CFU/mL), a test in the absence of NO_3^- and the presence of 300 mg/L of LAS was performed. No matter that a removal of 66% of LAS was detected, both reactors accumulated a concentration of 1.52 mg LAS/g SV, which decreased the elimination rate of COD to 60% in the acidogenic reactor, and inhibited methanogenesis in the methanogenic reactor. On a second experiment NO_3^- was added to the culture media to promote LAS degradation, and it was found that it increased to 73% in the acidogenic reactor, while there was no degradation in the methanogenic one. In spite of finding a lower accumulation of LAS in the sludge (0.84 mg LAS/g SV), the elimination of COD in both reactors sensibly decreased to around 50%.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

La digestión anaerobia se ha ido afirmando en México como un pretratamiento biológico efectivo para eliminar el 80 % de la materia orgánica de las aguas residuales (Monroy *et al.*, 1997) dejando un efluente que, tratado por vía aerobia, presenta una buena calidad para su descarga al ambiente a costos mucho menores que en sistemas aerobios estrictos (Sámano y Noyola, 1996).

Sin embargo el tratamiento biológico de ciertas aguas residuales que contienen compuestos tóxicos presenta algunos inconvenientes. Las aguas residuales generadas por las industrias del lavado de telas y los hospitales contienen hasta 300 mg/L de tensoactivos (Wagener y Schink, 1987). Su tratamiento biológico es complicado, ya que como Therien *et al.* (1984) apuntan, los alquil sulfonatos lineares (LAS, por sus siglas en inglés) en altas concentraciones disminuyen la eficiencia de remoción de la materia orgánica en sistemas aerobios. Asimismo, ocasionan la pérdida estructural de la biomasa activa, reduciendo así, las propiedades de sedimentación de los flóculos; además, disminuyen la transferencia de gases en el microsistema.

No se conoce un proceso que permita la biodegradación de los LAS por vía anaerobia (Federle y Schwab, 1992 y Hons, 1996), debido a que es tóxico ($DL_{50} = 200$ mg/L) para los lodos activados (Pérez, 1994). Sin embargo, la purificación directa de aguas residuales con altas concentraciones de LAS, empleando en primera instancia un sistema de tratamiento anaerobio, sería ventajosa si fuera posible lograr un alto porcentaje de biodegradación del tensoactivo y de la materia orgánica en tal sistema.

Soberón *et al.* (1996) aislaron una mutante de *Pseudomonas aeruginosa* (cepa M113) que es inocua para el hombre y que tiene la particularidad de ser aerobia, o desnitrificante cuando se desarrolla en un medio que contenga NO_3^- como

aceptor de electrones. Además, tiene la capacidad de degradar dodecil bencen sulfonato ramificado (BAS, por sus siglas en inglés). Como marcadores, la cepa M113 tiene resistencia a Cm y a HgCl². La integración de esta bacteria en un sistema de tratamiento de aguas residuales podría resultar en una alternativa atractiva para el tratamiento anaerobio de aguas residuales con altas concentraciones de tensoactivos de tipo LAS (superiores a los 200 mg/L).

Como primer paso, es necesario determinar la capacidad de degradación del LAS por la bacteria pura (obtener sus constantes cinéticas) bajo condiciones óxicas y anóxicas (adicionando NO₃⁻ para promover su desarrollo bajo esta última condición). Posteriormente, dentro del reactor se requiere evaluar el nivel de NO₃⁻ necesario para llevar a cabo la degradación de la molécula de LAS, sin que se llegue a detectar una cantidad apreciable de NO₃⁻ en el efluente ya que éste también es un contaminante.

El segundo aspecto a evaluar, es la posibilidad de integrar a la cepa M113 en los lodos del proceso de tratamiento de aguas residuales. Se decidió emplear un sistema anaerobio de tratamiento de aguas residuales en dos etapas; una primer etapa acidogénica y una segunda metanogénica, porque las *Pseudomonas* no son capaces de vivir bajo condiciones anóxicas estrictas, pero bajo condiciones acidogénicas son integrantes comunes del microecosistema (García, 1991). Así, la mineralización del LAS podría ser iniciada por la *Pseudomonas aeruginosa* y los primeros productos obtenidos podrían ser degradados por la misma bacteria o por la biota característica del primer reactor (bacterias desnitrificantes y acidogénicas), o inclusive, por los microorganismos del reactor metanogénico, para alcanzar su completa mineralización.

Debido a que los lodos acidogénicos son un ecosistema heterogéneo con una biota mezclada bajo condiciones locales fluctuantes, es necesario evaluar dos aspectos generales: 1) la bioaumentación del microorganismo, es decir la inoculación, integración (en los gránulos) y su persistencia en el microecosistema; y, 2) la degradación de la materia orgánica y el LAS por la asociación de la cepa M113 y demás microorganismos.

En un experimento preliminar se probó la capacidad para eliminar conjuntamente la materia orgánica y el LAS en el sistema antes descrito: un reactor UASB de dos etapas: acidogénica – metanogénica (García *et al.*, 1998).

El experimento, ilustrado en la figura 1, se llevó a cabo durante un periodo de 210 días, separados en 5 fases. Los volúmenes de los reactores fueron: acidogénico, 0.35 L de volumen útil (6 cm, 21 cm) con un TRH de 6 h.; y metanogénico, 1.4 L de volumen útil, (7 cm, 52 cm) con un TRH de 24 h. Como sustrato se usó la solución de RAMM (Anexo II). Durante las dos primeras fases el sistema se alimentó con 1 g/L de lactosa y 200 mg/L del LAS. Durante la fase I el reactor acidogénico (RA) parece degradar un 75% del tensoactivo adicionado ya que en el efluente de salida se detectaron 50 mg/L de LAS. Durante esta fase el reactor metanogénico (RM) se alimentó exclusivamente con agua residual artificial. Para la segunda fase se conectaron en serie los reactores acidogénico y metanogénico; la concentración detectada en el efluente de salida del RA subió a 75 mg/L. Por su parte, el RM aparentemente degradó una pequeña cantidad del tensoactivo. Sin embargo, el RA disminuyó paulatinamente su eficiencia de eliminación de materia orgánica hasta ser mínima, mientras que en el RM cayeron súbitamente los valores de remoción de la materia orgánica y de LAS al final de la segunda fase.

Debido al colapso del sistema se decidió suspender de la alimentación del sistema el LAS (fase III) y se mantuvo así hasta que éste recuperó su capacidad de remoción de la DQO en un 90%, proceso que demoró 70 días. Durante esta fase se detectó una desorción del LAS que se había acumulado en los lodos, sugiriendo que el LAS fue adsorbido durante las fases I y II por los lodos y no fue degradado como se pensó.

Al restablecer la alimentación con el LAS (fase IV), inmediatamente comenzó a disminuir la eficiencia de eliminación de la DQO en ambos reactores. Al aumentar la concentración del LAS a 300 mg/L (etapa V) la eficiencia de remoción de la DQO disminuyó significativamente en el reactor metanogénico. Asimismo, se registró una elevada concentración de LAS en el efluente de ambos reactores.

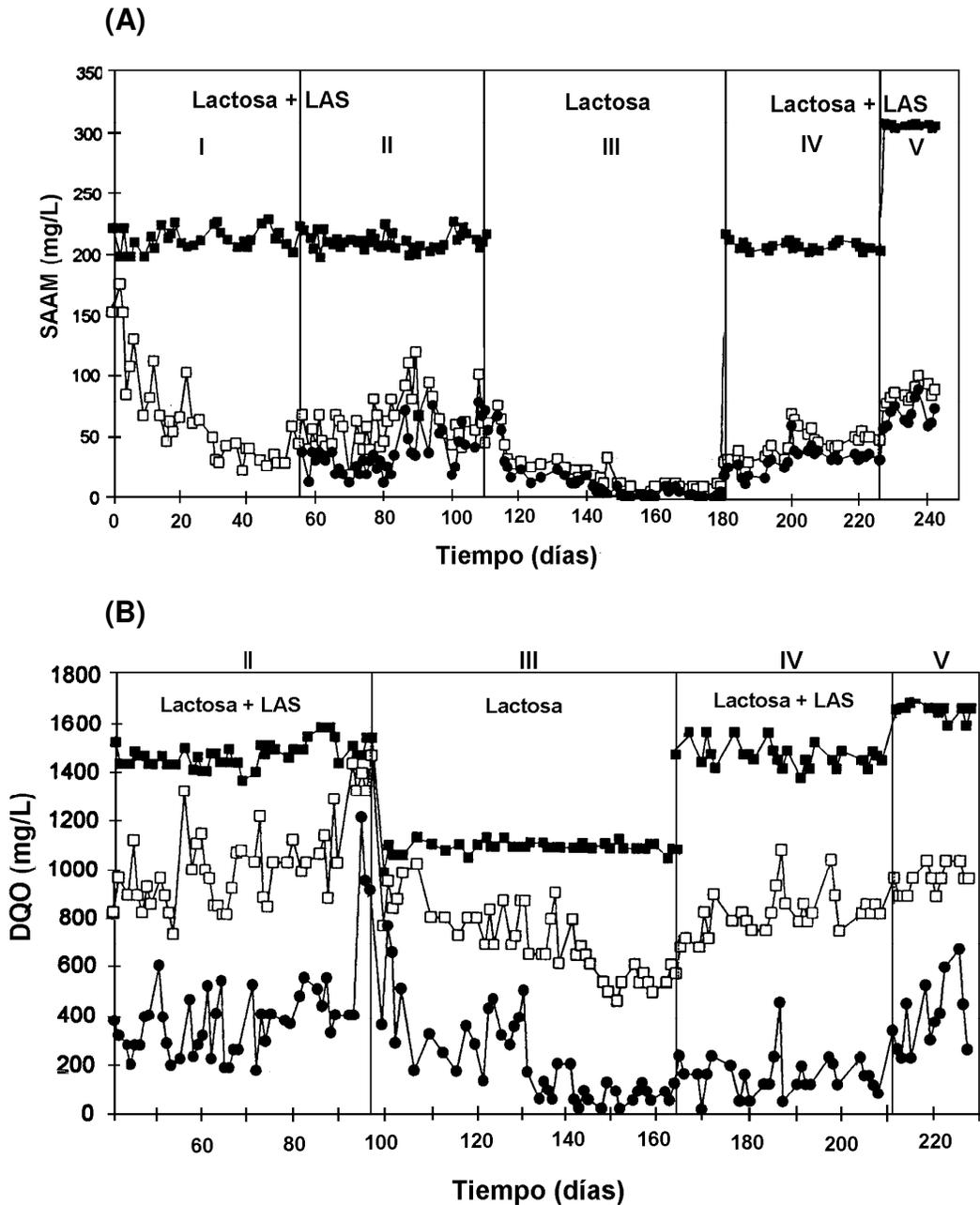


Figura 1. Remoción de: (A) LAS (detectado como SAAM); y, (B) materia orgánica (detertada como DQO) en el sistema en dos etapas acidogénico – metanogénico. -■- Entrada R. A.; -□- Salida R. A. y -●- Salida R. M. (García *et al.*, 1998).

Se concluyó que la microbiota del RA no es capaz de eliminar eficientemente concentraciones tan elevadas de LAS (>200 mg/L) siendo la mayor parte del tensoactivo adsorbido por los lodos de ambos reactores. Ello, ocasiona una inhibición de su biota, con la subsiguiente caída de la remoción de la materia orgánica.

1.2 SISTEMA DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

1.2.1 Reactor de lecho de lodos anaerobios de flujo ascendente (UASB).

Lettinga y Hulshoff-Pol, (1995) plantean varias ventajas de los sistemas anaerobios de tratamiento de aguas residuales procedentes de descargas industriales. Mencionan que esta tecnología es particularmente efectiva en la remoción de compuestos orgánicos; además, recientemente se han descubierto varios microorganismos con vías catabólicas capaces de mineralizar una amplia variedad de compuestos xenobióticos recalcitrantes.

El reactor de lecho de lodos anaerobios de flujo ascendente (UASB, por sus siglas en inglés), es actualmente uno de los sistemas más usados en el tratamiento anaerobio de aguas residuales (Macarie, 1996). La base de su funcionamiento es la biomasa aglomerada en gránulos, cuya alta densidad les permite permanecer en el fondo del reactor formando un lecho de lodos a través del cual pasa el agua residual. El resultado es que se pueden controlar el tiempo de residencia hidráulica (TRH) y el tiempo de retención de sólidos (TRS) de forma independiente en cada uno de los reactores. Este tipo de reactores soportan cargas de DQO de hasta 40 Kg DQO/m³·d, con TRH de algunas horas o días, dependiendo de la naturaleza del agua residual a tratar (Lettinga *et al.*, 1985).

Los gránulos anaerobios, que conforman el lecho de lodos, son una estructura estratificada formada por un consorcio de microorganismos que están en interdependencia. En su superficie y hasta una profundidad de 100 μm, se encuentran varios tipos de bacterias acidogénicas, hidrogenotróficas y probablemente fermentativas; mientras que en el centro se encuentran bacterias metanogénicas acetoclásticas y acetogénicas (Mc Leod *et al.*, 1990). Guiot *et al.* (1992) presentaron una estructura modelo del gránulo anaerobio; donde sitúan a los diferentes grupos tróficos en tres capas a lo largo del radio del gránulo, de tal forma que cada estructura agregada es un “arreglo metabólico” estable que crea las condiciones adecuadas de nutrición para todos sus miembros.

1.2.2 Reactor UASB en dos etapas.

Como se aborda en detalle en la siguiente sección, la digestión anaerobia puede dividirse en tres etapas bien diferenciadas, en las cuales las bacterias participantes tienen diferentes requerimientos nutricionales y despliegan diferentes funciones fisiológicas (Sección 1.3.1). Las bacterias acidogénicas se duplican en 30 minutos y otras en sólo unas pocas horas. Mientras que las bacterias OHPA tardan de 1.5 hasta 4 días, las bacterias metanogénicas acetoclásticas lo hacen en 2 ó 3 días; por su parte, las bacterias metanogénicas hidrogenotróficas presentan tiempos de duplicación de 6 a 11 horas (Viñas, *et al.* 1990). Las características metabólicas de estos grupos bacterianos se describen más adelante.

Estas diferencias cinéticas son la base de la separación física del proceso metanogénico en dos reactores. En el primero, se lleva a cabo la acidogénesis a valores de pH ácidos y a TRH cortos. En el segundo, las reacciones acetogénicas y metanogénicas se realizan a un valor de pH cercano a 7.0 y TRH largos. Los objetivos en la etapa acidogénica son producir AGV (sustrato para las bacterias del RM) y disminuir la acumulación de H_2 , para evitar la inhibición de las bacterias acetogénicas, logrando con ello la optimización del proceso (Olguín y Monroy, 1996).

Algunos ejemplos en los que se tratan aguas residuales con el sistema en dos etapas son: destilerías, cervecerías, aguas con almidones, fábricas de levadura e industrias químicas (Breure, 1995). La biodegradación de compuestos recalcitrantes se puede realizar en un sistema de degradación anaerobio en dos etapas, ya que en el primer reactor es posible romper las moléculas que se encuentren en altas concentraciones, permitiendo su total degradación por las bacterias acetogénicas y metanogénicas que se encuentran en el segundo reactor.

1.3 MICROBIOLOGÍA DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA

La digestión anaerobia es el conjunto de reacciones metabólicas que se llevan a cabo en ausencia de oxígeno molecular y que están encaminadas a lograr la degradación de diversos compuestos orgánicos hasta H_2 , CO_2 y CH_4 .

Las condiciones anóxicas se dan naturalmente en una amplia variedad de ambientes como son los fondos de aguas oceánicas (*e.g.* ventilas hidrotermales) y continentales (*e.g.* lagos, lagunas, manantiales hidrotermales, pantanos) o de microhábitats (*e.g.* tractos digestivos de animales, suelos profundos). Los microorganismos que habitan estos ecosistemas presentan una amplia diversidad, destacando las arqueobacterias productoras de CH₄.

1.3.1 Etapas de la digestión anaerobia.

El proceso de digestión anaerobio se puede dividir en tres etapas (Guyot, 1990), caracterizadas por la formación de una serie de productos que son sustratos de la siguiente etapa: la hidrólisis y fermentación, la acetogénesis y la metanogénesis. Las transformaciones de los sustratos en las diferentes etapas son realizadas por eubacterias y arqueobacterias; y, aunque se tiende a separarlas para su estudio, se encuentran íntimamente relacionadas, como se apunta en las siguientes secciones.

1.3.1.1 Etapa I. Hidrólisis y fermentación.

Muchos microorganismos aerobios y anaerobios tienen que romper grandes polímeros de proteínas (*e.g.* albúmina), azúcares (*e.g.* almidón, quitina) y lípidos (*e.g.* oleofinas, parafinas) como primer paso para la adquisición de nutrientes. Estas biomoléculas son hidrolizadas hasta aminoácidos; monómeros o dímeros de glúcidos; ácidos grasos volátiles como son el acético, butírico, valérico y propiónico; ácidos orgánicos (ácidos grasos con más de 5 carbonos), alcoholes, CO₂ e H₂.

La degradación de polímeros la realizan tanto hongos como bacterias. Las poblaciones del ecosistema varían según los sustratos disponibles. Entre los géneros representativos de bacterias hidrolíticas se encuentran: *Bacteroides*, *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Micrococcus*, *Ruminococcus*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Peptococcus*, *Selenomonas*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus* y *Streptococcus*; dentro de las bacterias fermentativas se agrupan:

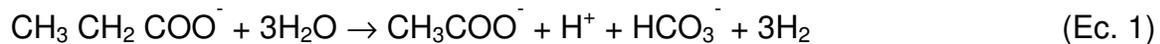
Acetivibrio, Acetofilamentum, Eubacterium, Acidaminococcus Butiribacterium, Veillonella, Anaerovibrio, Succinomonas, Succinivibrio, Fusobacterium, Megasphaera y *Streptococcus* (Iannotti *et al.*, 1982; García, 1991).

1.3.1.2 Etapa II. Acetogénesis.

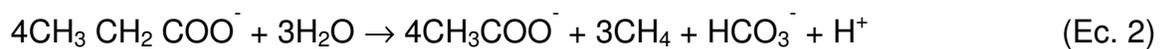
Los productos de la hidrólisis y de la fermentación son transformados en acetato, CO₂ e H₂ por bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno (OHPA, por sus siglas en inglés) y por bacterias homoacetogénicas. Estos grupos bacterianos se complementan para llevar a cabo la segunda etapa de la digestión anaerobia, la acetogénesis.

Las bacterias OHPA son inhibidas por el hidrógeno que producen; por tanto, si éste se acumula, el proceso anaerobio se detiene. De tal suerte, que estas bacterias co-evolucionaron con bacterias consumidoras de hidrógeno, (hidrogenofílicas) estableciendo una relación mutualista que logra mantener al ecosistema anaerobio en equilibrio.

El fenómeno que se presenta en esta relación se le conoce como “transferencia de hidrógeno interespecies” (Iannotti *et al.*, 1973 en: Mah *et al.*, 1977); y por este medio las bacterias OHPA, las bacterias metanogénicas hidrogenotrofas y las BSR, (en medios con sulfatos), realizan la acetogénesis usando AGV como sustrato; obteniendo al final un balance energético favorable. Las bacterias OHPA, usando propionato como sustrato inicial, obtienen un $\Delta G^{o'}$ > 0 (Ec. 1); mientras que, cuando se suman las bacterias metanogénicas hidrogenotrofas el $\Delta G^{o'}$ < 0 (Ec. 2).



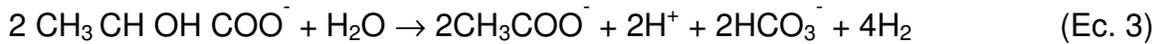
$$\Delta G^{o'} = 76.1 \text{ KJ/Reacción}$$



$$\Delta G^{o'} = -102.4 \text{ KJ/Reacción}$$

Las BSR también dan un $\Delta G^{o'}$ > 0 al usar lactato (Ec. 3), pero al interactuar con bacterias metanogénicas se obtiene un balance energético favorable (Ec. 4). Se

conocen muy pocas especies de bacterias OHPA. Las especies reportadas son *Syntrophobacter wolinii*, *Syntrophomonas wolfei*, *S. sapovorans*, *Syntrophospora bryantii* y *Syntrophus buswelli* (Mountfort *et al.*, 1984; Zhao *et al.*, 1990 y García, 1991).



$$\Delta G^{\circ} = 8 \text{ KJ/Reacción}$$



$$\Delta G^{\circ} = -143 \text{ KJ/Reacción}$$

Por su parte, las bacterias homoacetogénicas producen exclusivamente acetato a partir de CO_2 e H_2 (Ec. 5) o, empleando alguna fuente de carbono proporcionada por un sacárido (*e.g.* glucosa o sacarosa).



$$\Delta G^{\circ} = -104.6 \text{ KJ/Reacción}$$

Se han descubierto dos vías para la formación de acetato, la primera, reduciendo el CO_2 con los electrones obtenidos durante la fermentación; y la segunda, empleando directamente el H_2 gaseoso. Los géneros bacterianos que reducen compuestos carbonados son: *Clostridium*, *Butyribacterium* y *Peptococcus*; y los que usan directamente el hidrógeno son: *Acetoanaerobium*, *Acetobacterium*, *Acetogenium*, *Clostridium*, *Acetofilamentum*, *Acetomicrobium*, *Acetothermus*, *Acetitomaculum*, *Eubacterium* y *Sporomusa* (García, 1991).

1.3.1.3 Etapa III. Metanogénesis.

Las bacterias que se encuentran en los digestores se dividen en dos grupos tróficos: las bacterias hidrogenofílicas no acetoclásticas y las bacterias metanogénicas acetoclásticas. Las primeras son incapaces de usar el acetato como fuente de energía. Obtienen su energía oxidando hidrógeno, requiriendo para ello

CO₂ como aceptor de electrones (Ec. 6). Guyot (1990) ha comprobado que la mayoría de estas bacterias pueden metabolizar metanoato (Ec. 7). *Methanobacterium*, *Methanospirillum*, y *Methanobrevibacter* son los géneros representativos.



$$\Delta G^{\circ} = -135 \text{ KJ/Reacción}$$



$$\Delta G^{\circ} = -130 \text{ KJ/Reacción}$$

Por su parte, las bacterias metanogénicas acetoclásticas producen metano a partir del grupo metil del acetato (Ec. 8). En los digestores anaerobios el 73 % del metano producido proviene del acetato, de ahí la importancia de este grupo. Algunas de estas bacterias pueden utilizar como sustratos el metanol, las metilaminas y el hidrógeno.



$$\Delta G^{\circ} = -31 \text{ KJ/Reacción}$$

Las bacterias acetoclásticas se dividen en dos géneros: *Methanosarcina* y *Methanosaeta*. Las primeras son pseudosarcinas con baja afinidad por el acetato (tanto que el tiempo de duplicación promedio con este sustrato es de 30 horas); usan como sustratos principales la metilamina y el metanol, son inhibidas por el formato y el hidrógeno. Las especies representativas son la *Methanosarcina barkeri*, la *M. mazei* y la *M. thermophila* (Guyot, 1990).

El segundo género, *Methanosaeta*, también conocido como *Methanotherix* (Zehnder *et al.*, 1980) son bacilos filamentosos largos, que poseen una Km de 0.7-1.2 mM para el acetato. Al igual que las *Methanosarcinas* tienen tiempos de duplicación muy prolongados (65 - 70 horas). Estas bacterias usan en exclusiva el acetato y no son inhibidas por el hidrógeno o el metanoato. Las bacterias representativas son *Methanosaeta concilii* y *M. thermoacetophila* (Guyot, 1990).

La metanogénesis es realizada por bacterias metanogénicas estrictas. Producen el metano a partir de acetato, CO_2 e H_2 , ó de cualquier compuesto metilado como las metilaminas, metanoato, etanol, metanol, etc. (Balch *et al.*, 1979). Estas bacterias son inhibidas por concentraciones superiores a los 5 mg/L de oxígeno disuelto (Mah *et al.*, 1977) y para su óptimo desarrollo requieren de un pH de 6.7-7.8 y un potencial de óxido-reducción menor a -330 mV (Guyot, 1990).

En esta etapa el oxígeno molecular es inexistente, así como las moléculas donadoras de electrones (NO_3^- y SO_4^{2-}). La presencia de alguna de ellos promovería un cambio en la estructura del ecosistema, favoreciendo la proliferación de bacterias desnitrificantes o sulfato reductoras.

1.4 TENSOACTIVOS

1.4.1 Naturaleza de los tensoactivos.

Los tensoactivos son agentes activos que al concentrarse en las superficies e interfases de una solución acuosa, disminuyen la tensión superficial (Lucassen-Reynders, 1985).

Estructuralmente, un tensoactivo requiere de un grupo fuertemente hidrofílico y de uno fuertemente hidrofóbico en la misma molécula. Gracias a su grupo hidrofílico, un tensoactivo es soluble en agua. Sin embargo, su grupo hidrofóbico es repelido por el agua, por lo que la molécula tiende a alejarse de la fase acuosa. En la superficie (la interfase aire-agua), las moléculas se orientan con el grupo hidrofílico en el agua y el grupo hidrofóbico extendido en la interfase con el gas. El resultado es una disminución en la tensión superficial y un aumento de la tendencia a formar burbujas y espumas (Lucassen-Reynders, 1985). En presencia de líquidos inmiscibles, los tensoactivos, tienden a acomodarse en la interfase líquido-agua promoviendo la emulsificación en forma de gotas. En la interfase líquido-sólido, donde se puede considerar que están incluidos los microorganismos, disminuyen la

transferencia de oxígeno y solubilizan las membranas biológicas (Lucassen-Reynders, 1985).

1.4.2 Síntesis de los tensoactivos y su clasificación.

Los grupos hidrofóbicos e hidrofílicos y la forma en que se enlazan, pueden ser permutados y combinados para dar una variedad ilimitada de tensoactivos. En la tabla 1, se muestra que los grupos hidrofóbicos más usados son los radicales derivados de hidrocarburos, con un total de 10-20 átomos de carbono. En función de su carga, los tensoactivos pueden ser clasificados en tres diferentes tipos: no-iónicos, catiónicos y aniónicos.

Los tensoactivos no-iónicos contienen grupos hidrofílicos que no se ionizan apreciablemente en solución acuosa. Los de mayor interés industrial contienen un poliéter hidrófilo derivado del óxido de etileno. Más del 30% de los detergentes usados en la industria son de este tipo (Swisher, 1987).

Los tensoactivos catiónicos son aquellos que forman iones de tensoactivos cargados positivamente en solución acuosa; por ejemplo, los derivados del amonio cuaternario. El 10 % de los tensoactivos usados en la industria pertenecen a este tipo, sus principales atractivos son que actúan como suavizantes de telas y que poseen propiedades bacteriostáticas o microbicidas (Swisher, 1987).

Los tensoactivos aniónicos son aquellos que forman iones de tensoactivo cargados negativamente en solución acuosa, usualmente se sintetizan con los grupos sulfonato, sulfato y carboxilato. Éstos, representan la mayor parte de los tensoactivos de uso comercial (Swisher, 1987). La mayoría se sintetizan por sulfonación del hidrófobo deseado (Schick y Fowkes, 1996).

De este último grupo, los LAS y los BAS son los más ampliamente usados debido a sus excelentes propiedades como detergentes, su bajo costo y las atractivas propiedades físicas de sus formulaciones (figura 2). Sin embargo, estos compuestos no se biodegradan fácilmente por lo que en la década de los 80's se retiraron del mercado americano y europeo los tensoactivos del tipo BAS (Schick y Fowkes, 1996).

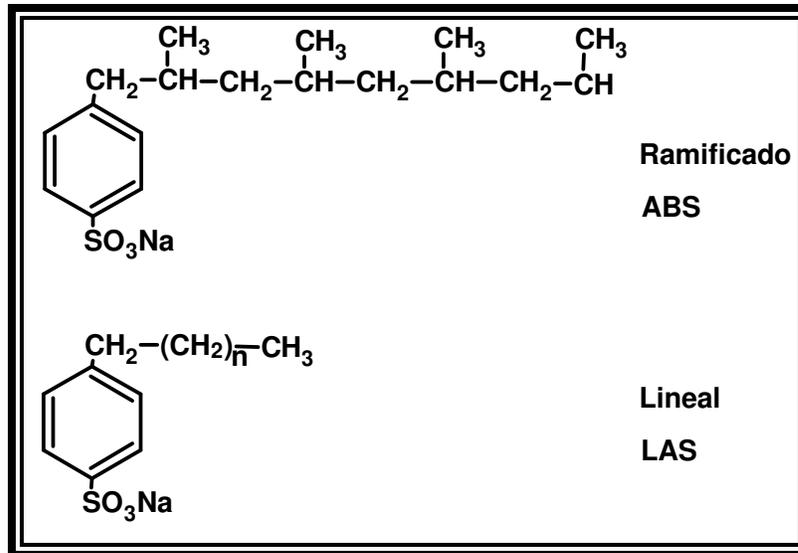


Figura 2. Estructura de los alquil bencen sulfonatos de sodio lineal (LAS) y ramificado (BAS).

Los LAS se obtienen por la reacción de un alquil benceno con ácido sulfúrico o con el trióxido de sulfuro para dar un ácido sulfónico (Ec. 9) que es neutralizado para dar la sal deseada, comúnmente una sal de sodio (Ec. 10). El grupo sulfonato predominantemente se forma en posición *para*; aunque una menor cantidad se acomoda en posición *orto* (Swisher, 1987).



1.4.3 Degradación de los tensoactivos del tipo LAS.

La biodegradabilidad aerobia de los principales tipos de tensoactivos alquil bencen sulfonatos lineares ha sido probada por varios investigadores (Patoczka y Pulliam, 1990; Okpokwasili y Olisa, 1991; Terzić *et al.*, 1992 y Takada *et al.*, 1994). Se sabe que los LAS son completamente mineralizados en plantas de tratamiento de aguas residuales cuando se presentan en concentraciones inferiores a los 30 mg/L. En su mineralización se encuentran involucrados varios microorganismos, los cuales conforman un consorcio donde cada uno degrada una parte de la molécula: algunos

la cadena hidrocarbonada y otros el componente aromático (Okpokwasili y Olisa, 1991).

La molécula del LAS tienen tres partes bien definidas en su estructura: la cadena alquílica, el anillo bencénico y el grupo sulfonato. El acomodo de dichas partes puede ser infinito, lo que da por resultado diferentes velocidades de degradación de la molécula. Para propósitos prácticos se revisará el efecto por separado de cada componente. En principio, se revisará como se afecta la velocidad de biodegradación del LAS de acuerdo a la posición del anillo bencénico sobre la cadena alquílica.

La aplicación de un análisis cromatográfico, realizado por Huddleston, (1963) (en Swisher, 1987) sobre la biodegradación de una mezcla de varios homólogos de LAS llevó a una relación que posteriormente fue verificada por otros investigadores: los isómeros con el grupo fenil unido cerca del fin de la cadena alquílica se degradan más rápido que los que se encuentran unidos al centro de la molécula (Swisher, 1987). Con ello se concluye que la velocidad de biodegradación depende claramente de la posición del grupo fenil sobre la cadena alquílica.

Con respecto a la longitud de la cadena alquílica, Swisher, 1987 comparó la biodegradación de los homólogos C_{12} y C_{14} sus resultados mostraron que el homólogo C_{14} desaparece más rápido que el C_{12} . Este fenómeno se repite para cada isómero individual de C_{14} comparado con el isómero correspondiente para el C_{12} . Otro ensayo mostró que la velocidad de degradación se incrementa rápidamente al aumentar el número de carbonos del homólogo C_6 al C_{12} , pero disminuye ligeramente de los homólogos C_{12} al C_{15} , para de nuevo incrementarse hasta el homólogo C_{18} (Swisher, 1987). Con estos resultados se concluye que conforme aumenta el número de átomos de carbono, se incrementa la distancia entre el anillo bencénico y el grupo metilo terminal, lo que permite que la velocidad de biodegradación de la molécula se incremente.

Como se apuntó la biodegradación de los tensoactivos tipo LAS es determinada por la naturaleza de la cadena alquílica y el anillo bencénico; por su parte, el grupo sulfonato no altera de forma significativa la biodegradación de la molécula.

1.4.3.1 Vías metabólicas para la biodegradación del LAS.

Para la completa mineralización del alquil bencen sulfonato se necesitan atacar tres estructuras químicas. Un sólo microorganismo difícilmente puede llevar a cabo la degradación completa de este tipo de tensoactivos; de hecho, sólo Soberón *et al.* (1996) han reportado la degradación del BAS por una sola bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* cepa W51D). El resto de los trabajos revisados reportan que la degradación es llevada a cabo por consorcios de microorganismos (Jiménez *et al.*, 1991; Sigoillot y Nguyen, 1992 y Hršak, 1996) donde unos microorganismos son capaces de utilizar los productos finales del metabolismo de otros. El tipo de vía metabólica que opera depende de la especie o especies predominantes en el microecosistema.

La biodegradación primaria puede llevarse a cabo por diferentes caminos, pero el más común es el que principia con la ω -oxidación de la cadena alquílica, seguido de un acortamiento de la misma por β -oxidación (Jiménez *et al.*, 1991; Sigoillot y Nguyen, 1992), tras este primer ataque se pierden las propiedades deterativas del LAS (Sigoillot y Nguyen, 1992). Los compuestos intermediarios resultantes son ácidos sulfofenílicos cortos, como el sulfofenil acetato y el ácido sulfobenzoico (Hršak, 1996), los cuales no son tan tóxicos como la molécula completa (Hons, 1996).

La necesidad de “aclimatar” a los lodos activados al tensoactivo, para que puedan degradarlo, indica que se encuentran involucradas enzimas inducibles en los estados iniciales de la degradación, muy probablemente enzimas que catalizan la reacción inicial del grupo metilo terminal (Swisher, 1987). Durante el proceso de aclimatación pueden acontecer los siguientes eventos: 1) síntesis *de novo* de permeasas, que transportan el LAS al interior de la célula, 2) síntesis *de novo* de oxidasas, que se requieren para realizar el ataque inicial del grupo metilo de la cadena alquílica, 3) síntesis *de novo* de enzimas, que tengan un menor impedimento estérico para unirse a las cadenas alquílicas de diferentes longitudes o que se acoplen mejor a la estructura molecular del tensoactivo. Todas estas enzimas se localizan inmersas en la membrana plasmática (Swisher, 1987).

En las siguientes secciones se describen en detalle los eventos más comunes en la biodegradación de las moléculas que conforman al tensoactivo de tipo LAS. En primera instancia se revisa como se degrada la cadena alquílica, después el anillo bencénico y finalmente como se procede a la desulfonación. Es importante aclarar que el orden de degradación de los diferentes componentes de la molécula en cuestión, es indistinto y cual es el primero en ser degradado depende del o de los organismos involucrados.

1.4.3.1.1 Degradación de la cadena alquílica: ω -oxidación.

Muchos datos experimentales sobre la biodegradación del LAS apoyan la hipótesis propuesta por Ryckman (1957) (en Swisher, 1987), que apunta que el ataque inicial al tensoactivo se da al final de la cadena alquílica en el grupo metilo terminal para obtener un grupo carboxilo, mediante el proceso conocido como ω -oxidación. Tras el primer ataque se produce el ácido graso o alcohol correspondiente, como los primeros productos identificables. La evidencia sobre el mecanismo exacto y los pasos intermedios en la ω -oxidación es conflictivo, probablemente porque las diferentes vías dependen de: a) el microorganismo particular involucrado; b) la longitud de la cadena; c) la posición del grupo aromático; y, d) otras características estructurales de la cadena alquílica (Swisher, 1987).

La vía más probable es la obtención del alcohol primario, el aldehído correspondiente y su ácido carboxílico (figura 3). Las evidencias sugieren que el primer paso es la adición de oxígeno molecular a la cadena alquílica, catalizado por una oxigenasa. Resulta un hidropéroxido primario, que entonces, es reducido a un alcohol primario (figura 3, rama izquierda). En otra opción, la deshidrogenación es la primera reacción (figura 3, rama derecha), seguida por una hidratación para dar el alcohol correspondiente.

Una vez que se ha formado el alcohol el siguiente paso es su oxidación a un aldehído, por intervención de la enzima alcohol deshidrogenasa. Una vez formado el ácido graso, el siguiente paso es su degradación por la vía de la β -oxidación.

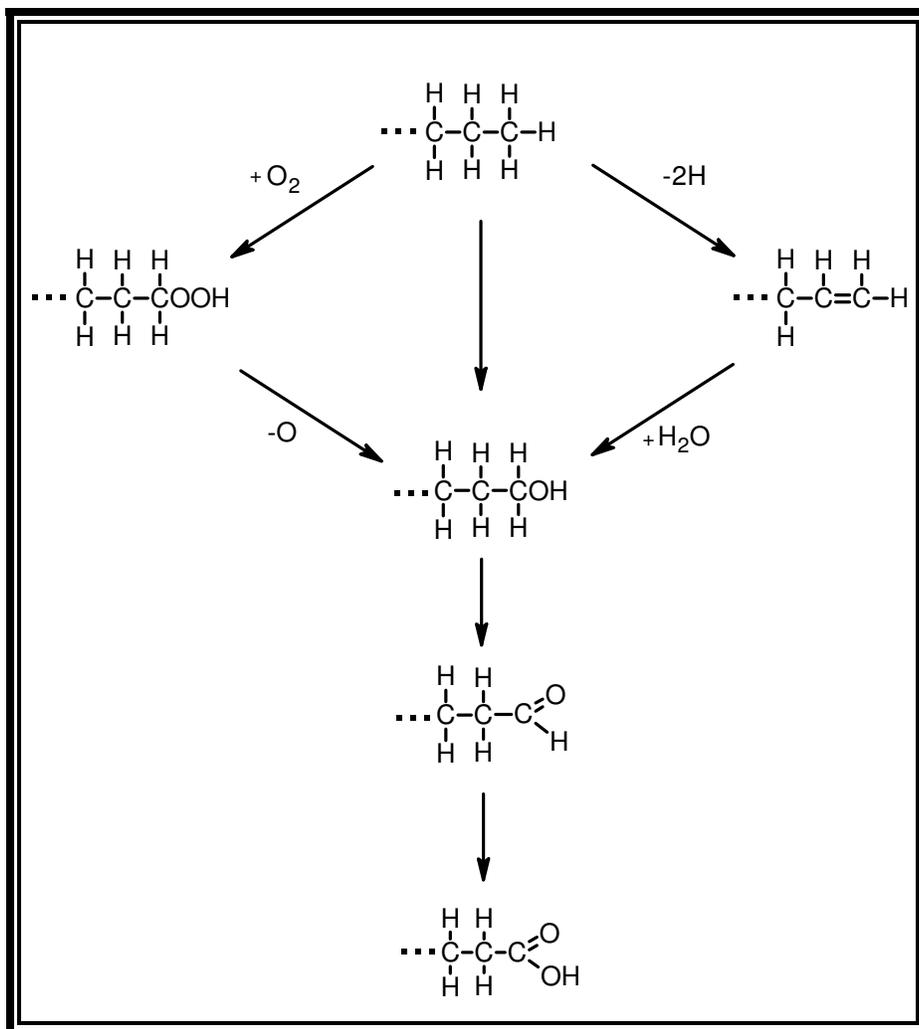


Figura 3. Mecanismos de obtención del alcohol primario a partir de la cadena alquílica por ω -oxidación. Rama derecha: deshidrogenación; rama izquierda: oxigenación (Adaptado de Swisher, 1987).

1.4.3.1.2 Degradación de la cadena alquílica: β -oxidación.

Como ya se explicó, se considera que la oxidación inicial de la cadena se completa cuando el grupo carboxil se ha formado. Los ácidos grasos resultantes son componentes universales de todos los organismos vivos, y usualmente son degradados por la vía de la β -oxidación (Lehninger *et al.*, 1993).

Particularmente para los LAS, la gran mayoría de los investigadores concuerdan en que la biodegradación de su cadena alquílica se da vía β -oxidación. Las principales evidencias son: a) el aislamiento de intermediarios carboxilatos más

cortos que los de la molécula inicial; y, b) la inducción de las enzimas involucradas en la β -oxidación después de la aclimatación de las bacterias al tensoactivo (Swisher, 1987).

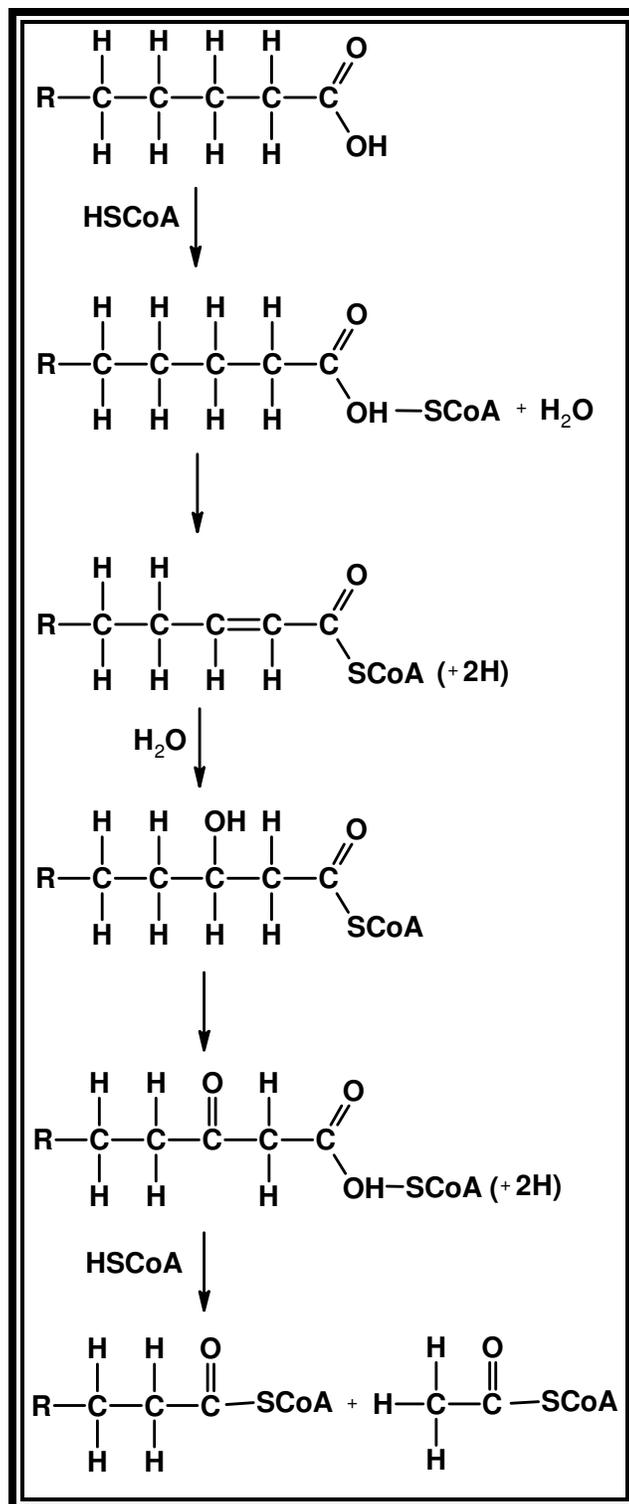


Figura 4. Biodegradación de un ácido graso vía β -oxidación (Adaptado de: Lehninger *et al.*, 1993).

Esta vía procede por la oxidación del ácido graso (dos carbonos a la vez) en una sucesión de grupos acetil. Éstos, son usados como fuente de energía para la célula o en algunas reacciones de síntesis (Lehninger *et al.*, 1993). En general, la reacción de la β -oxidación (figura 4) se desglosa en los siguientes pasos. Primero, el grupo carboxil es esterificado con la CoA, al menos dos pasos intermedios están involucrados. En la siguiente reacción, dos hidrógenos son removidos para dar el derivado α - β insaturado, que entonces es hidratado al β -hidroxi y después deshidrogenado al derivado β -ceto. Finalmente, otra molécula de CoA se adiciona entre los carbonos α y β , desplazando al acetil CoA y dejando un éster CoA del ácido graso, dos carbonos más corto que el inicial. La misma secuencia se repite hasta que el ácido graso se degrada totalmente (Lehninger *et al.*, 1993).

En los sistemas anaerobios también se usa el mecanismo de la β -oxidación. Bajo esta condición el último aceptor de hidrógeno parece ser un compuesto de un sólo carbono, (formando metano) o un compuesto de azufre (formando ácido sulfhídrico) o el que se encuentre disponible, dependiendo de las circunstancias y del microorganismo involucrado (Swisher, 1987).

1.4.3.1.3 Degradación del grupo bencen sulfonato.

El siguiente paso en la biodegradación del LAS, por lo común, es la ruptura del anillo aromático y su desulfonación (Cain, 1981 y Kertesz *et al.*, 1994). Los anillos aromáticos son moléculas comunes dentro de las células y no es de sorprender que todos los organismos tengan los mecanismos metabólicos necesarios para llevar a cabo su degradación (Lehninger *et al.*, 1993). Las dos rutas de degradación más comunes, como se muestra en las figuras 5 A y B, son la *orto* y la *meta* respectivamente (Sigoillot y Nguyen, 1992).

El catecol se toma como punto de partida porque es un intermediario común sintetizado del benceno o de los derivados de éste (benzoato, fenol, bencen sulfonato, etc.). En el caso de que el anillo aromático se encuentre unido a un carbono impar de la cadena alquílica (figura 5 A) se forma un ácido 4-hidroxibenzoico, entonces se hidroxila para dar un ácido 3,4-dihidroxibenzoico, la

molécula se escinde entre los carboxilos adyacentes y se oxida para obtener el ácido β -carboxi *cis,cis*-mucónico, finalmente, éste se reduce para formar el ácido β -cetoadípico (Sigoillot y Nguyen, 1992).

En el caso de que el anillo aromático se encuentre unido a un carbono par sobre la cadena alquílica (figura 5 B) se forma un ácido 4-hidroxifenil acético, que se hidroxila para dar un ácido 3,4-dihidroxifenil acético. El anillo aromático se rompe por una 2,3- dioxigenasa (vía *meta*), para obtener al ácido 5-carboximetil-2-hidroxi-2,4-dieno-1,7-heptadióico, compuesto que da paso al ácido 2-hidroxi-2,4-dieno-1,7-heptadióico (Sigoillot y Nguyen, 1992).

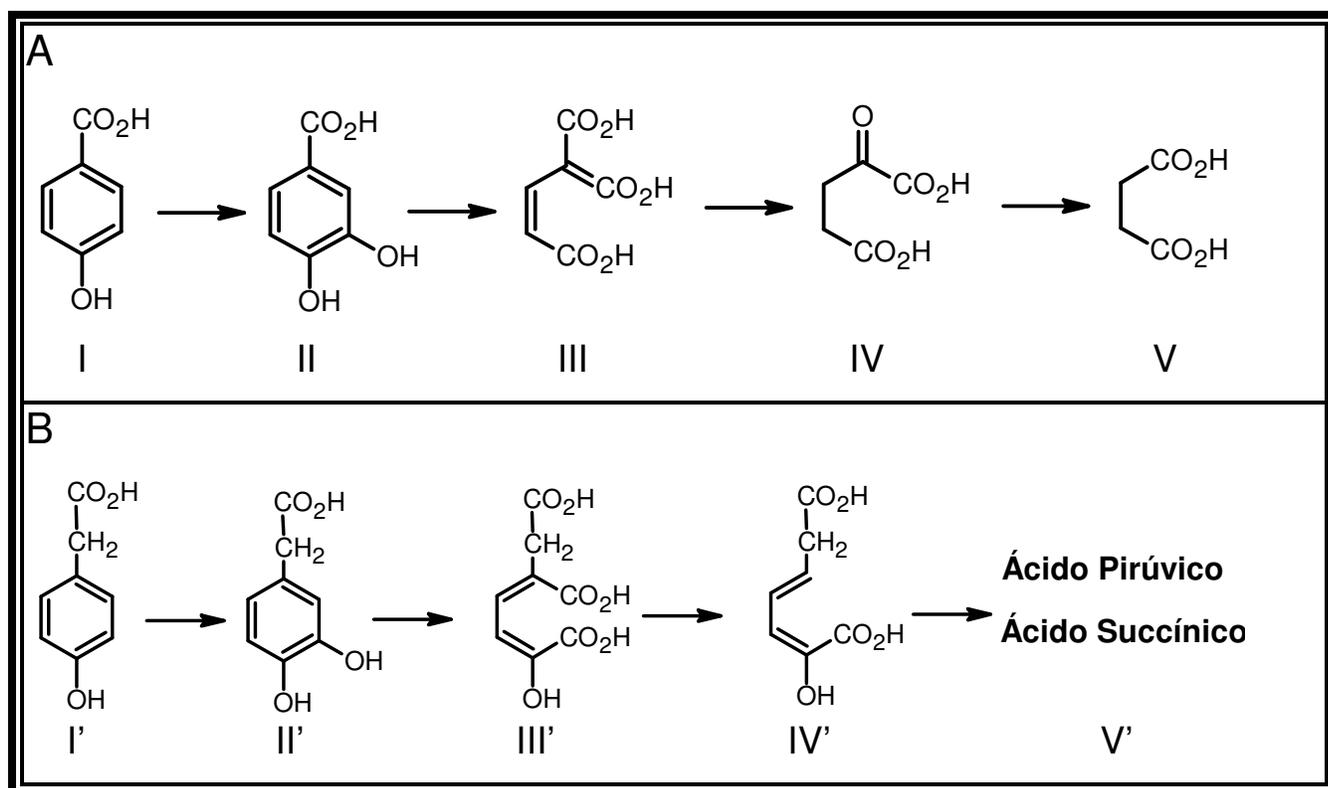


Figura 5. Productos intermedios de la degradación del anillo bencénico. "A" corte *orto* del ácido protocatecoico: I, ácido 4-hidroxibenzoico; II, ácido 3,4-dihidroxibenzoico; III, ácido β -carboxi *cis, cis*-mucónico; IV, ácido β -cetoadípico. "B" corte 2,3 *meta* del ácido homoprotocatecoico: I', ácido 4-hidroxifenil acético; II', ácido 3,4-dihidroxifenil acético; III', ácido 5-carboximetil-2-hidroxi-2,4-dieno-1,7-heptadióico; IV', ácido 2-hidroxi-2,4-dieno-1,7-heptadióico (Adaptado de: Sigoillot y Nguyen, 1992).

Los metabolitos finales de estas vías son los ácidos succínico y pirúvico, los cuales son compuestos celulares comunes que se usan en una amplia variedad de procesos metabólicos (Lehninger *et al.*, 1993).

En sistemas anaerobios, la biodegradación del anillo bencénico puede proceder por la vía inicial de la hidrogenación (Evans, 1977 y Eglund *et al.*, 1997), resultando un ciclohexano bencen carboxilato, que por la vía de la β -oxidación da un ácido pimélico (7 carbonos). Shlomi *et al.* (1978) encontraron evidencias de que éste puede ser posteriormente descarboxilado para dar un ácido caprónico, el cual mediante la vía de la β -oxidación produce 3 acetatos y, por último, genera metano y bióxido de carbono (figura 6).

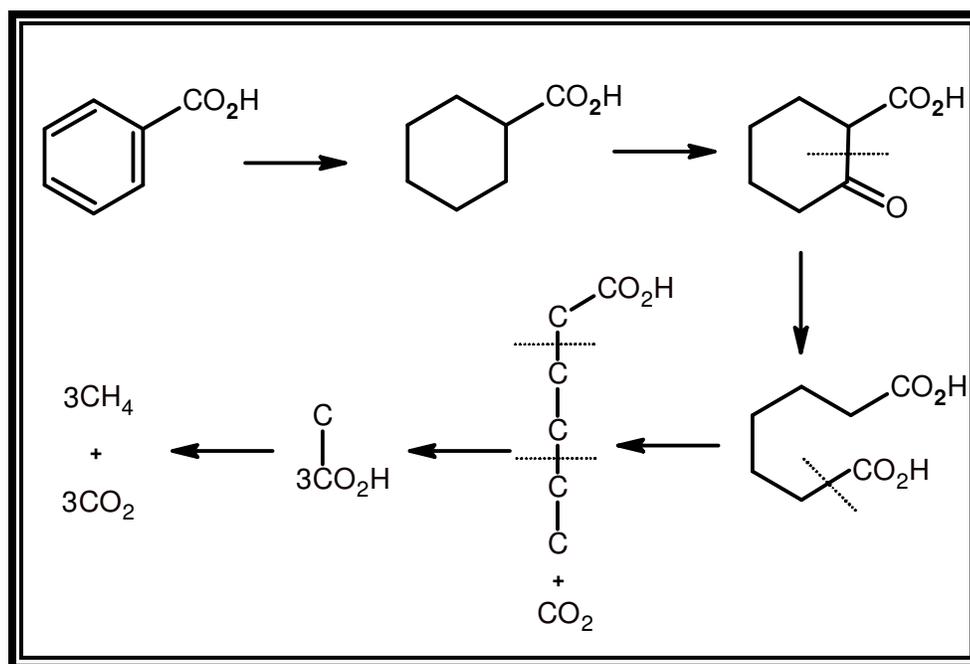


Figura 6. Degradación del anillo bencénico por vía anaerobia (Adaptado de Evans, 1977 y Shlomi *et al.*, 1978).

1.4.3.1.4 Desulfonación.

Para el bencensulfonato, la mayor parte de los datos experimentales disponibles indican que la desulfonación ocurre en las fases iniciales del proceso de biodegradación y se acompaña por la aparición de catecol o un alquilatecol que se

degrada usualmente por la vía *meta* antes descrita (Swisher, 1987). Las reacciones se ilustran en la figura 7.

Los primeros estudios de desulfonación concluían que ésta ocurría siempre en los primeros pasos de la vía de degradación del anillo aromático (Cain, 1981). Cuando el rompimiento del anillo aromático se da antes, el grupo sulfito es liberado y forma el ion sulfato, resultando en la formación del fenol correspondiente (Swisher, 1987). Ahora se conoce que la desulfonación también puede ocurrir en estados tardíos de la degradación del anillo aromático (Haug *et al.*, 1991; Locher *et al.*, 1991 y Feigel y Knackmuss, 1993).

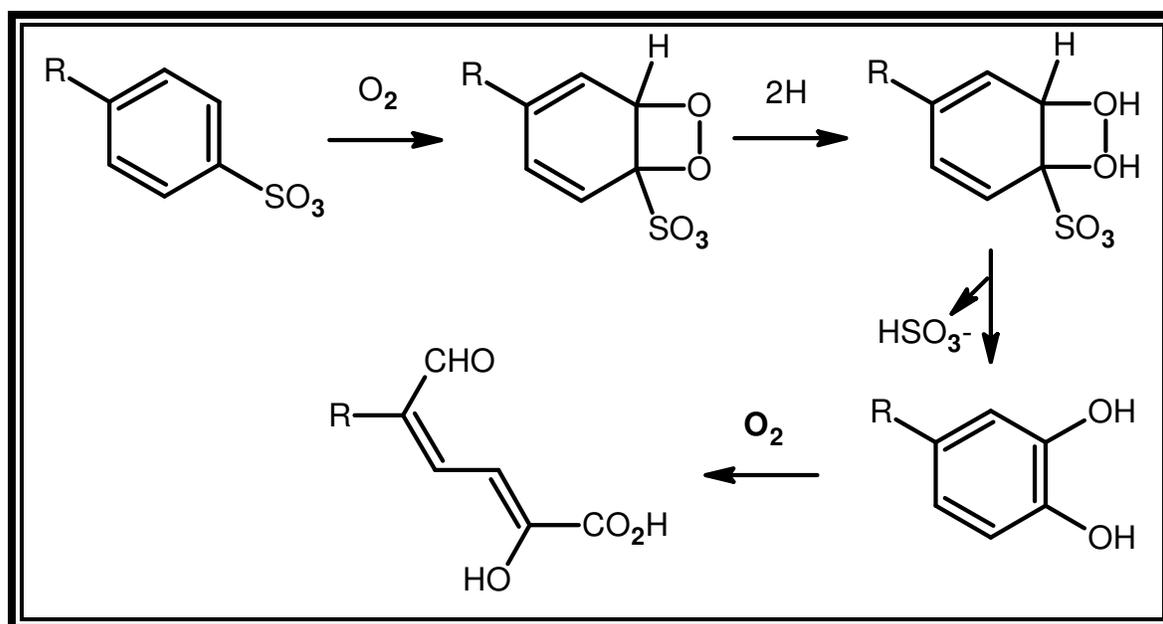


Figura 7. Eliminación del grupo sulfonato del anillo bencénico (Adaptado de Swisher, 1987).

En los tensoactivos del tipo LAS se cree que el sulfuro es eliminado en los últimos pasos de su biodegradación aerobia siguiendo a la oxidación inicial de la cadena alquílica para dar intermediarios carboxilatos tales como el sulfofenilbutirato (Jiménez *et al.*, 1991 y Sigoillot y Nguyen, 1992). La cepa W51D de *P. aeruginosa*, sin embargo lleva a cabo la desulfonación del anillo como primer paso en la degradación del BAS (Campos-García *et al.*, 1999).

1.4.4 Toxicidad de los tensoactivos del tipo LAS.

Para los mamíferos el LAS no es tóxico, al igual que muchos otros tensoactivos aniónicos y no iónicos. Su DL₅₀ oral, se encuentra en el orden de 1000 a 2000 mg por Kg de peso corporal, que es del mismo orden de magnitud en el que se encuentra el NaCl o el NaHCO₃ (Gloxhuber y Künstler, 1992). Por ejemplo, tras la administración de 7 dosis diarias consecutivas de 30 mg/Kg de LAS a monos Rhesus; no detectaron acumulación del tensoactivo en tejidos, el 94.3 % fue recuperado en orina y heces mientras que el resto se absorbió en el tracto intestinal. Los autores apuntan que el tensoactivo se metaboliza por la oxidación de su cadena alquílica, posiblemente por β -oxidación, pero no se degrada el grupo polar. Los metabolitos finales son del tipo ácido sulfofenil carboxílicos o ácidos dicarboxílicos (Cresswell *et al.*, 1978).

La adsorción cutánea de los detergentes aniónicos es baja, se incrementa con el tiempo de exposición y con el aumento de su concentración (Gloxhuber y Künstler, 1992). La piel humana tiene una permeabilidad muy baja a los detergentes. El efecto que ejercen sobre ella, es un aumento de su permeabilidad que permite la entrada de otros compuestos (Gloxhuber y Künstler, 1992).

Un estudio sobre la absorción de 8 tensoactivos aniónicos por microorganismos mostró que la absorción del LAS es significativamente mayor a valores de pH 3 y 4.7 que a 7, 9.2 y 11.4 (Yoshimura, 1984). El mismo autor proporciona los resultados de absorción sobre los componentes comerciales de una mezcla de C10 – C13, obteniendo las siguientes conclusiones: 1) la absorción se incrementa con la longitud de la cadena, C10<C11<C12<C13; 2) la absorción se incrementa con el decremento del pH, 9=8=7<6<5<4<3=2; y, 3) el nivel de absorción depende de la clase de organismo que se estudie, *Chlorella* sp. < *Microcystis aeruginosa* < *Escherichia coli* < *Staphilococcus aureus* < lodos activados (Yoshimura, 1984).

Los organismos de ecosistemas acuáticos (peces, moluscos, crustáceos y microorganismos) son en general más sensibles a los tensoactivos (Lewis, 1991). En peces se registran efectos sub-letales a partir de concentraciones de 0.1 mg/L. El

tensoactivo ocasiona la perdida del sentido del olfato, dificultad en el nado y daños en las branquias (Calamari y Marchetti, 1973).

En organismos como *Daphnia magna*, (especie de crustáceo usado comúnmente en pruebas de toxicidad acuática), los intervalos de toxicidad registrados van desde 0.005 hasta >10 mg/L, aunque la concentración tóxica mínima reportada es de 0.1 mg/L (Lewis, 1991). Los efectos de toxicidad para otros invertebrados son similares a los reportados para *Daphnia spp.* En general los organismos acuáticos sufren de toxicidad aguda por los LAS dentro del intervalo de 0.6-3.0 mg/L (Lewis, 1991).

Al igual que la velocidad de biodegradación del LAS, su toxicidad se encuentra estrechamente relacionada al tamaño de la cadena alquílica y a la posición del grupo fenilo sobre ella (Swisher, 1987). Las cadenas más largas del LAS son más tóxicas y su CL₅₀ de un homólogo a otro difiere drásticamente; por ejemplo, la CL₅₀ para el homólogo C₁₄ es de 1 mg/L mientras que para el homólogo C₈ se encuentra alrededor de 100 mg/L (Kimerle y Swisher, 1977). La toxicidad también se incrementa conforme el grupo fenil es posicionado del centro de la molécula hacia un extremo (Swisher, 1987).

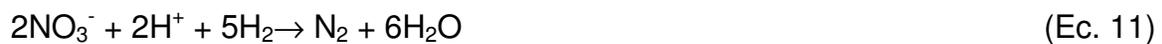
A nivel celular, los tensoactivos interactúan con la mayoría de los componentes de las membranas biológicas (lípidos y proteínas). Concentraciones de 1.6 mg SDS/mg lípido de membrana (aprox. 2 mg SDS/mL) son suficientes para solubilizar completamente a la membrana plasmática (Bartnik, 1992). Por ejemplo, una *Escherichia coli* con un bajo contenido de ácidos grasos insaturados en los fosfolípidos de su membrana celular es significativamente más sensible contra la lisis por SDS que una *E. coli* con un 30% más de ácidos grasos insaturados (Akamatsu, 1974). Así, la composición de los ácidos grasos de la membrana celular, parecen determinar la sensibilidad de la célula a los tensoactivos.

1.5 DESNITRIFICACIÓN

La desnitrificación es un proceso biológico por el cual los óxidos de nitrógeno, principalmente el nitrato y el nitrito, son reducidos a N₂O y N₂. Los óxidos de

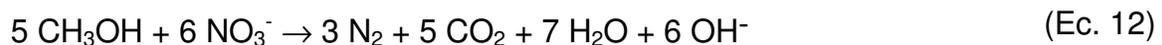
nitrógeno son usados en condiciones anóxicas como aceptores de electrones durante la generación del ATP (Muxí, 1994). A la desnitrificación también se le conoce como respiración de NO_3^- o reducción desasimilatoria de NO_3^- (Stouthamer, 1988).

Muchas bacterias pueden usar NO_3^- en lugar de oxígeno como aceptor terminal de electrones, es decir en forma facultativa. El primer paso del proceso es la reducción de NO_3^- a NO_2^- . Éste último también puede ser empleado como aceptor terminal de hidrógeno bajo condiciones anóxicas, siendo transformado a productos gaseosos, primero a N_2O y finalmente a nitrógeno molecular (Zehnder y Stumm, 1988). El cambio de energía libre de la reacción completa se muestra en la ecuación 11.



$$\Delta G^{\circ} = -1120.5 \text{ KJ / reacción}$$

Para realizar la desnitrificación se requiere añadir una fuente orgánica de carbono en proporción estequiométrica (Muxí, 1994). Para ilustrarlo, en la ecuación 12 se muestra que se necesitan 2.31 g NO_3^- /g metanol, para su degradación hasta CO_2 .



$$\Delta G^{\circ} = -578.9 \text{ KJ/Reacción}$$

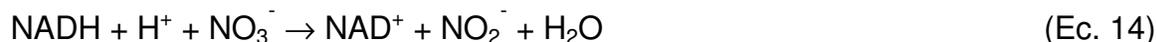
1.5.1 Regulación de la desnitrificación por el oxígeno.

La cantidad teórica de energía resultante al emplear oxígeno (Ec. 13) es mayor a la obtenida durante la desnitrificación (Ec. 14), como lo muestra el cambio en la energía libre estándar determinada para cada una de las reacciones. Por ejemplo, un reductor como el carbono orgánico podrá, desde un punto de vista termodinámico (aunque no necesariamente de un punto de vista cinético), reaccionar

primero con el oxígeno y entonces, sucesivamente, con el NO_3^- (Zehnder y Stumm, 1988).



$$\Delta G^{\circ'} = -216.5 \text{ KJ / reacción}$$



$$\Delta G^{\circ'} = -142.5 \text{ KJ / reacción}$$

En general, la desnitrificación es un proceso inducido por la reducción de la concentración de oxígeno y su eventual agotamiento en el medio (Zehnder y Stumm, 1988). Cuando todo el oxígeno ha sido empleado, el sistema se vuelve anóxico o anaerobio (el oxígeno no está disponible en forma libre); entonces, los microorganismos usan aceptores de electrones alternos; así, desde un punto de vista energético, el NO_3^- es el siguiente mejor aceptor de electrones (Brock y Madigan, 1993).

El proceso de desnitrificación es favorecido preferentemente sobre la metanogénesis (cuando están presentes óxidos de nitrógeno), debido a que su $E^{\circ'}$ es mayor. Por ejemplo, al comparar la ganancia de energía en la desnitrificación (Ec. 15) con respecto al uso del fumarato (Ec. 16) como aceptor de electrones es evidente que la reacción de la desnitrificación es energéticamente más viable (Uden *et al.*, 1994).



$$E^{\circ'} = + 420 \text{ mV}$$



$$E^{\circ'} = + 30 \text{ mV}$$

De esta forma, la disponibilidad de los aceptores de electrones en el ecosistema, determinan la sucesión ecológica de los microorganismos que catalizan

las reacciones de óxido-reducción respectivas. Dependiendo del proceso que se lleve a cabo la ganancia de energía varía significativamente (tabla 2).

Tabla 2. Procesos RedOx mediados por bacterias y su cambio de energía libre (Adaptada de Zehnder y Stumm, 1988).

Proceso RedOx	$-\Delta G^{\circ}$ (KJ/equivalente)
Respiración aerobia	125.1
Desnitrificación	118.8
Reducción de Nitrato	81.8
Fermentación	29.6
Reducción de Sulfato	25.4
Reducción Metano	23.2

Como se mencionó, la desnitrificación es inducida por el agotamiento en la concentración del oxígeno presente; ya que en muchas bacterias las condiciones anóxicas inducen la síntesis de las enzimas necesarias para llevar a cabo la desnitrificación (Unden *et al.*, 1994). Como se ha revisado la desnitrificación es inhibida por el oxígeno; por ello, el proceso ocurre principalmente en ambientes anaerobios, aunque existen algunos estudios en los que se ha detectado el proceso de desnitrificación en ambientes con bajas concentraciones de oxígeno (Zehnder y Stumm, 1988). Con las evidencias presentadas se puede concluir que la regulación de la desnitrificación está asociada a la disponibilidad de oxígeno libre en el medio; siendo la ausencia de éste último un factor determinante para que se presente el fenómeno de la desnitrificación.

1.5.2 Metabolismo de compuestos xenobióticos por bacterias desnitrificantes.

Aunado a la gran variedad de productos naturales que son empleados como sustratos para la desnitrificación, ciertos compuestos aromáticos y xenobióticos también pueden ser degradados por organismos desnitrificantes (Zehnder y Stumm, 1988). El uso de estas bacterias en la mineralización de compuestos xenobióticos es

una atractiva opción para futuras investigaciones por varias razones: a) los desnitrificantes tienen una tasa de crecimiento relativamente rápida y se desarrollan en condiciones anóxicas; b) la manipulación genética está muy avanzada en el género desnitrificante, más específicamente en el *Pseudomonacea*; y, c) la adición de NO_3^- a sitios contaminados para mejorar el proceso de remoción de los compuestos contaminantes es muy rentable debido a su solubilidad y bajo costo (Zehnder y Stumm, 1988). El último punto no es necesariamente una constante empleada en el tratamiento de aguas residuales ya que muchas de las aguas residuales poseen óxidos de nitrógeno disueltos. A este respecto, es prudente mencionar que la presencia de nitratos se puede aprovechar al momento de diseñar la estrategia de remoción de materia orgánica y otros contaminantes de un agua residual particular.

Sólo se ha estudiado el destino metabólico de unas cuantas moléculas en los microorganismos desnitrificantes. Los resultados son muy alentadores, ya que demuestran que poseen el potencial para mineralizar contaminantes de forma muy efectiva. Varios de los compuestos aromáticos, que se conoce son incorporados a vías metabólicas óxicas, hoy día, también se sabe que pueden ser metabolizados por vías anóxicas (UM-BBD, 2000).

El potencial de degradación de las bacterias anóxicas se ha explotado bastante en los últimos años. Muchas sustancias transformadas aeróbicamente, también pueden ser degradada en ausencia de oxígeno y en algunos casos la degradación es más eficiente que la realizada en condiciones óxicas. Muchos sustratos que en presencia de oxígeno son atacados por oxigenasas experimentan, básicamente, diferentes reacciones de degradación en ausencia de oxígeno (Schink, 1988). Algunas de las reacciones "sustitutas" son: la hidratación, deshidratación, hidrogenación, deshidrogenación, carboxilación y descarboxilación. A ellas se le suman algunas reacciones recién descubiertas como: dehidroxilación, dehalogenación, deaminación, transhidroxilación y demetilación. Estas reacciones se han reportado como las empleadas por los microorganismos para la degradación de algunos compuestos xenobióticos (Schink, 1988).

La desnitrificación tiene un gran potencial en el tratamiento de aguas residuales, ya que puede remover permanentemente el exceso de nitrógeno en ambientes locales al completar el ciclo natural del mismo (Knowles, 1982) y de forma simultánea, se pueden degradar una amplia variedad de compuestos xenobióticos recalcitrantes. Por ejemplo, Zehnder y Stumm (1988) mencionan a microorganismos desnitrificantes que degradan detergentes no iónicos. Los nueve inóculos se desarrollaron, tanto aerobia como anaeróbicamente, empleando SDS como única fuente de carbono, bajo condiciones anóxicas crecieron en alquil sulfatos de 6 a 12 carbonos pero no en análogos más cortos. La alquil sulfatasa presente en ambos cultivos convirtió a los tensoactivos al ácido graso correspondiente, el cual se presume, fue metabolizado por medio de la β -oxidación.

1.5.3 Diversidad de las bacterias desnitrificantes.

Las desnitrificantes son básicamente bacterias óxicas que tienen la capacidad alterna de reducir óxidos de nitrógeno cuando el oxígeno se vuelve un factor limitante. Por ello, no necesitan medios o procesos anaerobios estrictos; de hecho, su crecimiento es más factible y rápido cuando el cultivo desnitrificante se inocula inicialmente en un medio aerobio (Knowles, 1982). El crecimiento por respiración aerobia del cultivo agota entonces el oxígeno, y gradualmente, permite al cultivo cambiar al metabolismo desnitrificante. Si un inóculo de este tipo se transfiere a un medio anaerobio estricto, el crecimiento se retrasará o se inhibirá, por la inhabilidad del inóculo para generar la energía necesaria para sintetizar las enzimas desnitrificantes requeridas (Zehnder y Stumm, 1988).

La mayoría de los organismos desnitrificantes aislados de la naturaleza poseen la vía completa, $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$, pero existen cepas que carecen de la habilidad para reducir $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$ y $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ (Unden *et al.*, 1994); por ejemplo, *Wolinella succinogenes* carece del paso $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2\text{O}$ (Yoshinari, 1980).

Los principales géneros de bacterias desnitrificantes conocidos son: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Rhizobium*, *Halobacterium*, *Neisseria*,

Paracoccus, *Propionibacterium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Thiobacillus*, *Thiosphaera* y *Vibrio* (Brock y Madigan, 1993). Pero los desnitrificantes más comunes en la naturaleza son los pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Alcaligenes*. En relación a éstos, los otros géneros son mucho muy raros o prevalecen únicamente en ambientes especializados (Brock y Madigan, 1993).

El género *Pseudomonas* es el más diseminado; sus representantes son habitantes comunes de ambientes marinos, dulceacuícolas y terrestres, donde cumplen una importante función en la mineralización de la materia orgánica. Algunas especies causan enfermedades en plantas y exhiben un amplio grado de diversidad de hospederos, mientras que otras, son patógenos ocasionales de animales. Muchas de las especies estudiadas, incluyendo las parasíticas, no requieren factores de crecimiento y pueden desarrollarse en un medio mineral con una sola fuente de carbono. Sólo algunas requieren de vitaminas o aminoácidos adicionales. El lactato, el succinato y la glucosa pueden ser usadas por la mayoría de las especies. Algunas cepas son capaces de usar alrededor de 100 diferentes sustratos como fuentes de carbono, pues presentan una alta diversidad enzimática, lo que les confiere la capacidad para degradar una amplia variedad de compuestos químicos (Buchanan y Gibbons, 1984). El género ha sido reportado como uno de los dominantes en los lodos activados (Hashimoto *et al.*, 1987 y Garcia, 1990), además de ser resistentes a la inanición, pueden sobrevivir por largos periodos en un ecosistema natural (van der Merr *et al.*, 1987).

1.6 BIOAUMENTAR PARA BIOREMEDIAR

La biorremediación es una técnica que emplea microorganismos (protocistas, hongos, eubacterias y arqueobacterias) para degradar contaminantes ambientales del suelo, agua o aire. Para llevar a cabo el proceso se tiene que adicionar al medio (inocular) una población de microorganismos o una mezcla de poblaciones (en ocasiones, acompañados con factores de crecimiento específicos) en el ecosistema contaminado, con el fin de lograr la mineralización de los compuestos contaminantes (Alexander, 1994), a este método se le denomina bioaumentación.

En los protocolos de remediación de la contaminación se pueden emplear sistemas físicos y químicos; sin embargo, estos procesos son bastante caros, y comúnmente su uso genera una alteración sustancial sobre el ecosistema. De tal suerte que si se posee un proceso de tratamiento biológico de los desechos lo suficientemente efectivo, resulta ser el más deseable por ser muy barato, por realizarse en el sitio de contaminación y por causar un impacto mínimo en el área circundante (Alexander, 1994). Por ejemplo, la bioaumentación se ha usado con éxito para limpiar fugas subterráneas de tanques de almacenamiento de gasolina a muy bajos costos (Moller *et al.*, 1995).

Cada vez más procesos industriales generan y vierten en sus efluentes de salida una gran variedad de compuestos, los cuales no son utilizados por la microbiota nativa o por los lodos activados de las plantas de tratamiento de aguas residuales. Adicionalmente, muchos de estos compuestos ejercen una cierta toxicidad sobre la microbiota, lo que complica el proceso de depuración del efluente ya que inhibe la acción de remoción de la materia orgánica y demás moléculas contaminantes. Es aquí cuando toman relevancia las estrategias de bioaumentación dirigidas a la mineralización de él o los compuestos causantes del problema.

Las primeras experiencias de bioaumentación se realizaron como una alternativa para la biorremediación de suelos (Jobson *et al.*, 1974). Actualmente una de las ramas más prometedoras del método es la optimización del tratamiento de aguas residuales. En general, la bioaumentación mejora la eficiencia del sistema de tratamiento, logrando una rápida y significativa reducción del olor. También reduce el tiempo de arranque del proceso de remoción y favorece la biodegradación de sustancias recalcitrantes (que de otra manera son difíciles de mineralizar); además, reducen la cantidad de lodos e incrementan la clarificación del agua tratada (National Research Council, 1993).

1.6.1 Estrategias de bioaumentación para la degradación de xenobióticos.

En los diferentes ecosistemas se encuentra una amplia diversidad de microorganismos que poseen la capacidad para degradar una gran cantidad de

compuestos orgánicos. Usualmente compuestos generados por otros organismos pertenecientes a los diferentes niveles tróficos del ecosistema y a los que se han adaptado a consumir para obtener sus nutrimentos. Sin embargo, muchos compuestos sintéticos (xenobióticos) persisten por más tiempo en el ambiente (son recalcitrantes), y aunque pueden ser biodegradados, la velocidad con que se mineralizan es muy baja. Esto se debe a que, *in situ*, los compuestos xenobióticos son “moléculas nuevas”, a las que los microorganismos no han estado expuestas, es decir, no han evolucionado para usarlas como alimento, por tanto no poseen las enzimas necesarias para degradarlas.

Afortunadamente, la enorme diversidad de enzimas que los procesos de evolución biológica han “generado” entre los microorganismos de ambientes extremos, nos proporciona una fuente (aún no cuantificada) de la cual se pueden aislar y aprovechar tales enzimas, para fines biotecnológicos, entre ellos el de la biodegradación de compuestos xenobióticos recalcitrantes.

Se pueden presentar dos posibles escenarios. Uno, en el que el contaminante pueda ser degradado por un microorganismo o un consorcio presente en el área contaminada. En esta situación, comúnmente, la densidad de su población comparada con la de otras especies suele ser muy baja dentro del ecosistema. En tal caso, el aislamiento del microorganismo o del consorcio y su multiplicación *in vitro* para su posterior inoculación, es la estrategia de bioaumentación a seguir (National Research Council, 1993).

Las ventajas que se derivan de esta última estrategia son, en primera instancia, 1) la rapidez con que comienza el proceso de degradación microbiano, el ataque al xenobiótico se inicia tan pronto como se “contamina” el sitio, ya que los microorganismos no requieren de un periodo de adaptación prolongado a las condiciones microambientales; y, 2) la capacidad de degradación, intrínseca del consorcio de microorganismos, puede ser favorecida y acelerada por la aireación del sustrato, la adición de nutrientes orgánicos y/o de los aceptores de electrones apropiados (Andreoni *et al.*, 1998).

En un segundo escenario, donde no se encuentren en el ecosistema los microorganismos capaces de degradar la molécula contaminante; la estrategia

consiste en integrar al ecosistema a microorganismos no-nativos, los cuales posean la particularidad de degradar el contaminante deseado (National Research Council, 1993). En primera instancia el método parece simple, sin embargo, la inoculación de microorganismos no-nativos no siempre es efectiva ya que su capacidad de degradación depende directamente de los factores bióticos y abióticos con los que se enfrenta al integrarse al nuevo ecosistema; ello presenta una serie de situaciones particulares que se tienen que superar con soluciones “hechas a la medida” para cada caso de biorremediación (Andreoni *et al.*, 1998).

Para incrementar las probabilidades de éxito en el proceso de biorremediación por bioaumentación con microorganismos no-nativos, es imprescindible considerar los factores abióticos (pH, temperatura, salinidad y disponibilidad de nutrientes, etc.) y bióticos (competencia con microorganismos autóctonos, presencia de poblaciones depredadoras, etc.), puesto que estos factores determinan en gran medida la supervivencia y actividad de los microorganismos introducidos. Finalmente la respuesta del inóculo a las condiciones prevalecientes dependen de su fenotipo y genotipo, de su plasticidad genética (van Veen *et al.*, 1997).

Por consiguiente, el principal problema de la bioaumentación con microorganismos no-nativos es encontrar y aislar los microorganismos capaces de mineralizar moléculas recalcitrantes y capaces de adaptarse a las condiciones naturales prevalecientes en el ambiente blanco. Por ejemplo, en ambientes inusualmente fríos se tienen que liberar organismos psicrófilos, los cuales están adaptados las bajas temperaturas; por el contrario, en ambientes cálidos se deben escoger microorganismos termófilos. Éstas y otras consideraciones permiten establecer una estrategia de biorremediación apropiada.

1.6.2 Efectos de los factores bióticos y abióticos sobre el inóculo.

En general, el tamaño de la población bacteriana disminuye rápidamente después de su introducción en un ambiente natural. El fenómeno se atribuye al ambiente “hostil”, suma de las condiciones bióticas y abióticas a las que se enfrentan los microorganismos.

Los factores abióticos ejercen un efecto directo sobre la dinámica de la población introducida, ya que somete a las células a varios tipos de estrés (tabla 3).

Tabla. 3. Factores que influyen la supervivencia de los microorganismos en el medio acuoso.

Origen	Factor	Efecto	Referencia
Biótico	Depredación	Decremento de la población celular.	Heijnen <i>et al.</i> , 1988
	Competencia	Decremento de la población celular / baja velocidad de incremento de la población.	Heijnen <i>et al.</i> , 1988
Abiótico	Nutrimientos inorgánicos	Su limitación resulta en la inanición y la disminución del tamaño celular.	Givskov <i>et al.</i> , 1994
	Fuente de carbono	Selección de especies oligotróficas, la limitación de la fuente de carbono resulta en la inanición, reducción de la actividad y disminución del tamaño celular.	Colbert <i>et al.</i> , 1993 y Haack <i>et al.</i> , 1995
	pH	Selección de especies tolerantes, disponibilidad de nutrientes, actividad de compuestos tóxicos.	van Veen <i>et al.</i> , 1997
	Temperatura	Afecta la actividad metabólica; la presión predatora se afecta.	van Veen <i>et al.</i> , 1997
	Xenobióticos	Inhibición de organismos sensibles, selección de los organismos resistentes, tolerantes o degradadores.	van der Meer <i>et al.</i> , 1992
	Aceptores de electrones	Sucesión de las poblaciones: aerobia > desnitrificante > sulfato reductora > metanogénica.	Andreoni <i>et al.</i> , 1998

Los factores abióticos también pueden actuar indirectamente al influenciar la actividad de la microbiota nativa, que compite con el microorganismo introducido. Las condiciones de estrés son, de primera instancia, los factores fisicoquímicos como la escasez generalizada de los nutrientes de fácil acceso (*e.g.* C, N y P), los aceptores de electrones (*e.g.* el oxígeno, los óxidos de nitrógeno o de azufre, etc.), los pHs extremos y los compuestos químicos tóxicos (generalmente los xenobióticos recalcitrantes).

En adición a los factores abióticos, los otros factores que intervienen significativamente en la disminución de la población inoculada son los bióticos (tabla 3). El argumento clave que valida este hecho son las observaciones de Heijnen *et al.* (1988) que determinaron que una población introducida en un suelo estéril no disminuye tan sensiblemente como una adicionada en otro no estéril. Este resultado se puede extrapolar a sistemas acuosos.

Los 2 factores biológicos más comunes son: la competencia, que es el antagonismo que se establece entre las poblaciones nativas y el organismo no-nativo por los sustratos y el espacio físico disponible (ambos constituyen el nicho biológico); y la depredación, que es la presión de caza que ejercen otros organismos (protozoarios y bacterias) sobre el organismo no-nativo. Además de los factores mencionados, también existen otras posibles relaciones entre los microorganismos (inter o intraespecíficas) y que de igual manera influyen para determinar el destino del microorganismo inoculado en el sistema.

1.6.3 Bioaumentación con microorganismos no-nativos.

En la actualidad, existe un creciente número de aplicaciones biotecnológicas que involucran la introducción de microorganismos capaces de degradar contaminantes sintéticos con gran rapidez. Algunos de estos microorganismos son modificados genéticamente (principalmente bacterias y hongos), es decir, les son insertados genes de otro organismo (directamente en su genoma, o por medio de algún vector como los plásmidos) para conferirle la capacidad deseada. Otros, son

mutantes que tienen altos índices de degradación; y unos más, son organismos aislados de ambientes extremos que presentan vías metabólicas poco comunes.

Prácticamente en cualquier ambiente contaminando se pueden encontrar bacterias óxicas y anóxicas., Para elaborar un diseño racional de las metodologías de uso de microorganismos en los sitios contaminados, es necesario analizar sus bases genéticas y bioquímicas para la degradación de compuestos xenobióticos recalcitrantes en diferentes ambientes. Afortunadamente existe una gran diversidad de microorganismos con vías catabólicas y “genes novedosos”. Vodyanov (1997) menciona que actualmente se conocen por lo menos cinco vías de degradación del tolueno en bacterias y hongos, y al menos una vía anaerobia en bacterias. Asimismo, en bacterias metanogénicas, se han descubierto nuevos procesos metabólicos que incluyen la deoloración y la degradación de compuestos aromáticos (*e.g.* bencenos, xilenos, etilbencenos, etc.).

Se ha intentado integrar cepas bacterianas puras que degradan algún compuesto xenobiótico específico dentro de sistemas de tratamiento de aguas residuales y suelos (van der Meer *et al.*, 1987; Jain *et al.*, 1987; McClure *et al.*, 1989; Jones *et al.*, 1991; Fujita *et al.*, 1991; Kandel *et al.*, 1992; y Fujita *et al.*, 1994) pero no tuvieron éxito porque la bacteria: 1) perdía su capacidad para eliminar compuestos xenobióticos; 2) no expresaba su capacidad de degradación por usar preferencialmente otras fuentes de carbono; y, 3) no se adaptó al ecosistema y fue desplazada (Goldstein *et al.*, 1995).

Por tal motivo, se requieren microorganismos que cumplan con ciertos requisitos que son de menor importancia en el cultivo *in vitro*. Los más importantes son: 1) mantener una herencia estable de las funciones adquiridas; 2) el nivel de la expresión de las funciones modificadas no debe ser tan alto que constituya una desventaja selectiva para el organismo, particularmente cuando compite con los organismos nativos del hábitat blanco; 3) no debe ser un patógeno potencial, sobre todo cuando se le confiere la resistencia contra antibióticos; y, 4) su estabilidad ecológica tendrá que ser elevada (Goldstein *et al.*, 1995).

El término de estabilidad ecológica hace referencia al periodo que puede sobrevivir una cepa pura expresando sus características útiles dentro de un

microecosistema (Fujita *et al.*, 1994). Si su estabilidad es baja, el microorganismo terminará por ser desplazado por la biota nativa que se encuentra mejor adaptada al ambiente, pero si la estabilidad ecológica es alta, el microorganismo se incorporará al ecosistema, sobreponiéndose a interacciones como la depredación, la competencia por sustratos con la población autóctona y las variantes ambientales.

Tomando en cuenta los aspectos antes mencionados, a continuación se enlistan algunas recomendaciones para escoger los microorganismos a utilizar dentro de algún proceso de biorremediación o tratamiento de aguas residuales:

1. Trabajar con microorganismos que posean un nicho estable, o bien, que sea un género dominante en el ecosistema blanco.
2. Evitar que sea una especie muy depredada o que entre en competencia con los microorganismos nativos.
3. Que use preferentemente, como fuente de carbono, al compuesto contaminante y no a la principal fuente de carbono del medio.
4. Que sea resistente a cambios ambientales relativamente extremos (pH, temperatura, deshidratación, etc.).

2 HIPÓTESIS

La remoción de concentraciones de alquil bencen sulfonato mayores de 300 mg/L en un reactor anaerobio UASB en dos etapas es nula. Tras la inoculación de la cepa M113 de *Pseudomonas aeruginosa* al sistema, se logrará la remoción del tensoactivo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general.

Mejorar la eliminación de tensoactivos alquil bencen sulfonato (LAS) en el proceso de tratamiento de aguas residuales en un reactor anaerobio UASB en dos etapas, inoculando el reactor acidogénico con una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (M113) que degrada altas concentraciones de LAS (300 mg/L).

3.2 Objetivos particulares.

Determinar las constantes cinéticas de la cepa M113 para la degradación de LAS *in vitro*; en condiciones óxicas y anóxicas (empleando NO_3^- como aceptor de electrones).

Evaluar la estabilidad ecológica de la *Pseudomonas aeruginosa* cepa M113 en el reactor acidogénico (RA).

Determinar la eficiencia de remoción del LAS y de la materia orgánica en el sistema una vez que la bacteria se ha integrado al RA.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 REACTIVOS QUÍMICOS

El alquil bencen sulfonato de sodio lineal (LAS) fue suministrado por Química Hoechst de México (Anexo I). Todas las sustancias químicas usadas fueron de las compañías Sigma o Merck, con pureza grado reactivo.

4.2 CEPA BACTERIANA

La bacteria empleada en este estudio fue una *Pseudomonas aeruginosa* cepa M113, que es una mutante obtenida a partir de la cepa W51D (Soberón *et al.*, 1996). Esta bacteria puede desarrollarse empleando el alquil bencen sulfonato ramificado como única fuente de carbono, pero es incapaz de crecer usando lactosa. Es resistente a cloramfenicol (Cm) y a las sales de mercurio.

4.3 CONDICIONES DE CULTIVO *IN VITRO* DE LA CEPA M113 Y DETERMINACIÓN DE SU BIOMASA

La cepa M113 se cultivó en botellas serológicas con 50 mL de volumen de cultivo, a una temperatura de 35° C y bajo agitación (250 RPM). El medio de cultivo se compone por las soluciones minerales de RAAM 1 y 2 (ver, Anexo II), más 1 g/L de glucosa ó 0.3 g/L de LAS. Todos los cultivos *in vitro* fueron suplementados con 30 µg/mL de Cm y 5 µg/mL de HgCl₂ como marcadores. Para obtener las condiciones anóxicas, el medio de cultivo se desoxigenó llevándolo a ebullición y cambiando la composición de su atmósfera de aire por nitrógeno. A estos medios se les agregó KNO₃ en cantidades estequiométricas suficientes para consumir las concentraciones de LAS y de glucosa empleadas (ver sección 4.12).

El crecimiento de la cepa M113 se determinó por densidad óptica con un espectrofotómetro (600 nm). Los datos fueron transformados a biomasa (mg/L), usando una curva de calibración generada sobre el peso seco de cultivos con una absorbencia conocida. El coeficiente de correlación, 0.99702 fue aceptable (figura 8). Al final de los experimentos todos los cultivos bacterianos fueron esterilizados antes de su disposición final.

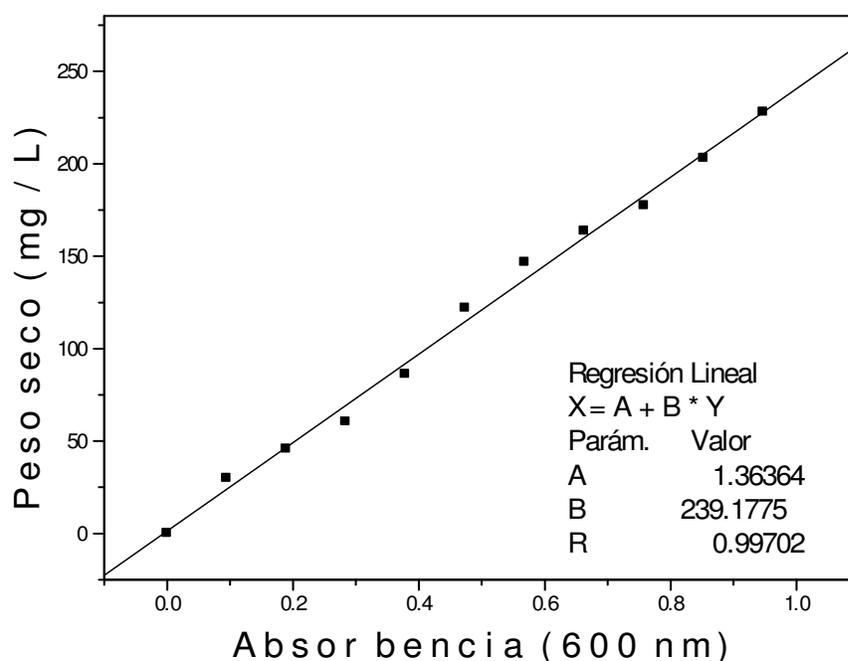


Figura 8. Curva de calibración de peso seco contra absorbencia para la cepa M113.

4.4 REACTORES DE LECHO DE LODOS CON FLUJO ASCENDENTE (UASB)

Para los experimentos de digestión anaerobia en dos etapas, los reactores UASB se instalaron como se esquematiza en la figura 9 (Monroy, 1998). Los reactores se mantuvieron en un cuarto de temperatura controlada a $35 \pm 2^\circ \text{C}$ durante el tiempo de experimentación. Los tamaños de los reactores fueron: el acidogénico, de 0.35 L de volumen útil (6 cm, 21 cm) con un TRH de 6 h.; y el metanogénico, de 1.4 L de volumen útil, (7 cm, 52 cm) con un TRH de 24 h. Se alimentaron con medio de RAMM (Anexo II), y dependiendo del experimento se adicionaron 1 g/L de lactosa más 200 ó 300 mg/L de LAS. Se llevaron a cabo dos

corridas. En la primera se inocularon 4.6×10^8 UFC/mL de la cepa M113; y al inicio la segunda, la concentración celular determinada de la cepa M113 fue de 3.4×10^3 UFC/mL; además, en esta etapa se adicionaron 270 mg de NO_3^-/L .

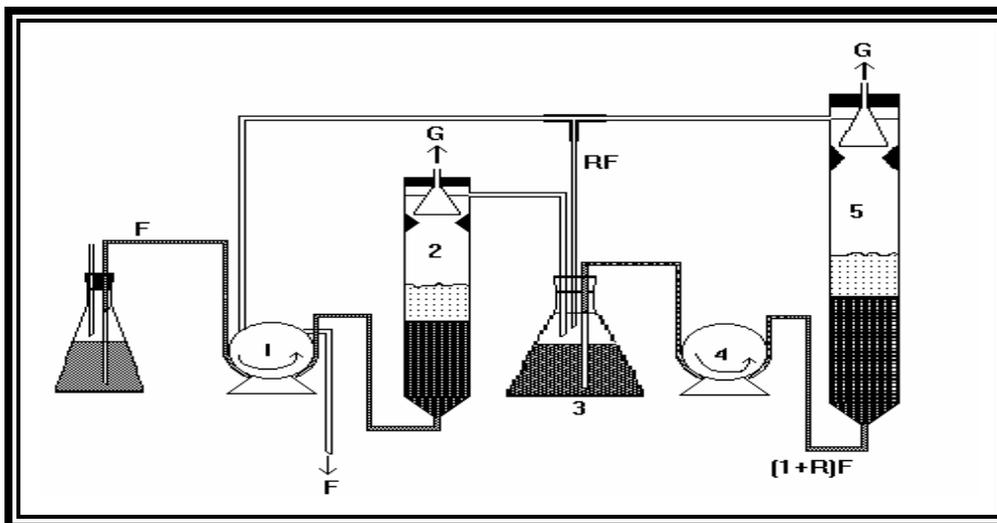


Figura 9. Reactores anaerobios de laboratorio tipo UASB conectados en serie. Se muestra el separador gas-sólido-líquido y la alimentación en la base del reactor. F: caudal de alimentación, R: fracción de recirculación, G: caudales de biogás producido, 1: bomba peristáltica de alimentación y salida, 2: reactor UASB acidogénico, 3: matraz de recirculación, 4: bomba de alimentación, 5: reactor UASB metanogénico (Monroy, 1998).

4.5 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN EN PLACA DE LA CEPA M113

Con la cuantificación en placa se estimó el número de *P. aeuroginosa* viables en una muestra de lodos. Como los microorganismos se encuentran agregados en los flóculos de los lodos acidogénicos, éstos fueron sometidos a ultrasonido para separarlos. Se sonicó 1 mL de lodo en tres tandas de un minuto separadas por 30 segundos de agitación. Después se aspersó el lodo homogéneamente en la caja Petri con el medio selectivo (Eaton, *et al.*, 1995). Se incubó durante 1 ó 2 días a 35°C , hasta obtener colonias visibles, y se procedió a su conteo. El medio de cultivo selectivo constó de un amortiguador de fosfatos a pH 7.0 adicionado con LAS como única fuente de carbono, $30 \mu\text{g/mL}$ de Cm y $5 \mu\text{g/mL}$ de HgCl_2 . Sobre este medio selectivo, pero sin la adición de los dos

marcadores mencionados, no se detectó crecimiento bacteriano al usar el mismo lodo antes de la inoculación de la cepa M113.

4.6 DETERMINACIÓN DEL ALQUIL BENZEN SULFONATO (LAS)

El LAS se cuantificó con el método de sustancias activas al azul de metileno (SAAM). Las SAAM llevan a cabo la transferencia del azul de metileno, una tinta catiónica, de una solución acuosa a un líquido orgánico inmiscible en agua. Esto ocurre a través de la formación de un par iónico entre el anión SAAM y el catión del colorante. La intensidad del color azul resultante en la fase orgánica es una medida de las SAAM. Se hicieron 3 extracciones sucesivas con CHCl_3 -a partir de un medio acuoso ácido- con azul de metileno en exceso, seguidas de un lavado a contracorriente con agua. La cuantificación del colorante acarreado en el CHCl_3 se hizo determinando su absorbencia a 652 nm (Eaton, *et al.*, 1995).

4.6.1 Cuantificación del LAS en los lodos.

Para estimar la concentración de LAS absorbida por los lodos se centrifugó 1 mL de lodo por 3 min a 13,000 g (para eliminar el medio de cultivo), la pastilla se resuspendió en agua destilada y se recentrifugó bajo las mismas condiciones, se homogeneizó y se llevó a un volumen final de 100 mL. La concentración de SAAM se determinó como antes se describió.

4.7 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES POR FENOL – SULFÚRICO

Este método se usa para la determinación de azúcares y sus derivados metilados (oligosacáridos y polisacáridos). El método es rápido, simple y sensible, además de dar resultados reproducibles y de usar reactivos baratos y estables (Dubois *et al.*, 1956). A un volumen de muestra de 2 mL, se le adicionó 1 mL de fenol al 5 % y 5 mL de ácido sulfúrico (CUIDADO, se debe escurrir lentamente por

la pared del tubo). Se dejó reposar por 10 min y se incubó en agua a 30° C por 20 min, se dejó enfriar y se registró su absorbencia a 480 nm.

4.8 DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO (DQO)

La DQO es una medida del oxígeno necesario para oxidar totalmente a la materia orgánica de una muestra, para tal motivo se usa un oxidante químico. El método de reflujo cerrado con dicromato de potasio, es preferido debido a su gran capacidad de oxidación, su aplicabilidad sobre una amplia variedad de muestras y su fácil manipulación. En la mayoría de los compuestos orgánicos se logra del 95 al 100 % de oxidación del valor teórico (Eaton, *et al.*, 1995). A 2 mL de muestra se le adicionó 1 mL de $K_2Cr_2O_7$ y 2 mL de $H_2SO_4 + Ag_2SO_4$, la muestra se homogeneizó y se incubó por 2 h a 150° C, se dejó enfriar y se cuantificó su absorbencia a 620 nm.

4.9 CUANTIFICACIÓN DE NO_3^- Y NO_2^-

La concentración de NO_3^- y NO_2^- se determinó por electroforesis capilar (Waters Quanta 4000) empleando un tubo microcapilar (fused silica, 50 cm · 75 μ m). Las muestras se centrifugaron a 13,000 g por 10 min y se filtraron a través de una membrana de celulosa de 0.45 μ m. La aplicación electrostática es de 20 KV, 38 μ A y la longitud de onda de 240 nm. Como electrolito se usó una solución de sulfato de sodio (Gómez *et al.*, 1996).

4.10 CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A MASAS

Para identificar algunos de los productos resultantes de la degradación del LAS por la cepa M113, se empleó la cromatografía de gases acoplada a masas (CG/MS).

La muestra analizada se tomó a las 70 horas de iniciado el cultivo. Para separar el componente biológico se tomó 1 mL del cultivo, se centrifugó por 10

min. a 13,000 g. La pastilla se empleó para la microscopía (ver siguiente sección); el sobrenadante se separó y se filtró empleando un equipo de ultrafiltración millipore de 0.25 μm . El líquido obtenido se usó para realizar el ensayo, usando un cromatógrafo de gases HP 5890 serie II, con un detector de masas 5972; y una columna HP Ultra II de 30 m (0.2 mm d. i.). Se usó He como gas acarreador a un flujo de 27 cm/s. La temperatura de inyección fue de 280° C, con una rampa de 8° C/min de 110° a 300° C y un tiempo final de 5 min (Tabor y Barber, 1996). La identificación de las moléculas presentes en la muestra se realizó empleando la biblioteca de espectros de masas (NBS75K HP).

4.11 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Se procesaron los cultivos bacterianos con 70 horas de crecimiento. Se centrifugó 1 mL del cultivo a 13,000 g por 10 min, la pastilla resultante se fijó con glutaraldehído al 3% a 20° C por 1 hora. Posteriormente, se lavó con un amortiguador de fosfatos 0.1 M. La muestra se deshidrató en serie usando etanol con una concentración inicial de 30% hasta llegar al 100%, con incrementos de 10% cada 15 min. Después se secó al punto crítico con CO₂. Empleando un ionizador (6' 30" Au 1,200 V 5 mM = 0.15 Torr.) se recubrió con oro para su observación en el microscopio electrónico de barrido de alto vacío.

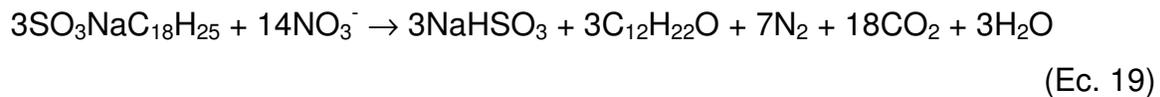
4.12 CÁLCULOS ESTEQUIOMÉTRICOS PARA LA ADICIÓN DE NO₃⁻

Para los ensayos *in vitro* se usaron las siguientes ecuaciones estequiométricas para determinar la cantidad de NO₃⁻ necesaria para realizar la completa oxidación del LAS y la glucosa respectivamente.



Por lo tanto, para la degradación del LAS se necesitan 2.88 g NO₃⁻/g LAS, mientras que para la glucosa 1.37 g NO₃⁻/g C₆ H₁₂ O₆.

En el experimento con el sistema de tratamiento de aguas residuales se adicionó suficiente NO₃⁻ para llevar a cabo la degradación de la molécula de LAS al alcohol y el anillo bencen sulfónico con la degradación de este último. Las moléculas consideradas como resultantes son dodecanol, CO₂ y sulfonato (Ec. 19). Se necesitan 0.84 g NO₃⁻/g LAS.



4.13 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS

El coeficiente específico de crecimiento (Y) se obtiene con la ecuación 20. X₀ y S₀ son la biomasa y el sustrato inicial, X y S son la biomasa y el sustrato en el punto máximo de crecimiento.

$$Y = (X - X_0) / (S_0 - S) \quad (\text{Ec. 20})$$

La ecuación 21 representa la velocidad de crecimiento (μ). La tasa de muerte celular (d) se obtiene de la ecuación 22, cuando μ = 0.

$$\mu = \text{LN} (X_0 - X) t \quad (\text{Ec. 21})$$

$$\delta x / \delta t = \mu x - d x \quad (\text{Ec. 22})$$

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 CRECIMIENTO *IN VITRO* DE LA CEPA M113 CON DIFERENTES SUSTRATOS

Como se mencionó en la sección de Materiales y Métodos, la cepa M113 de *Pseudomonas aeruginosa* tiene la capacidad de degradar el alquil bencen sulfonato ramificado (70% de 200 mg/L), es resistente al cloramfenicol y a las sales de mercurio. Además, presenta una temperatura óptima de crecimiento de 35° C. Estas características hacen de la cepa M113 un candidato viable para tratar de eliminar altas concentraciones de tensoactivos de tipo LAS de ciertos efluentes.

Antes de la bioaugmentación del sistema anaerobio de tratamiento de aguas residuales con la cepa M113, se procedió a determinar *in vitro* sus constantes cinéticas para la remoción de glucosa o de una mezcla comercial de alquil sulfonato (ver Anexo I) como únicas fuentes de carbono; bajo condiciones tanto óxicas como anóxicas (adicionando NO_3^- como aceptor de electrones para esta última).

En la figura 10 se muestran las cinéticas de crecimiento de la cepa M113 en medios adicionados con 1 g/L de glucosa y con 0.3 g/L LAS, bajo condiciones óxicas. Con glucosa, el cultivo entró en su fase estacionaria alrededor de las 22 horas, alcanzando los 206.3 mg/L de peso seco. El cultivo con LAS alcanzó su mayor producción de biomasa en 14 horas (116.1 mg/L); ésta fue aproximadamente un 55% menor que la obtenida con glucosa. Después, la biomasa del cultivo cayó a 75 mg/L y se mantuvo estable por un periodo de 86 horas.

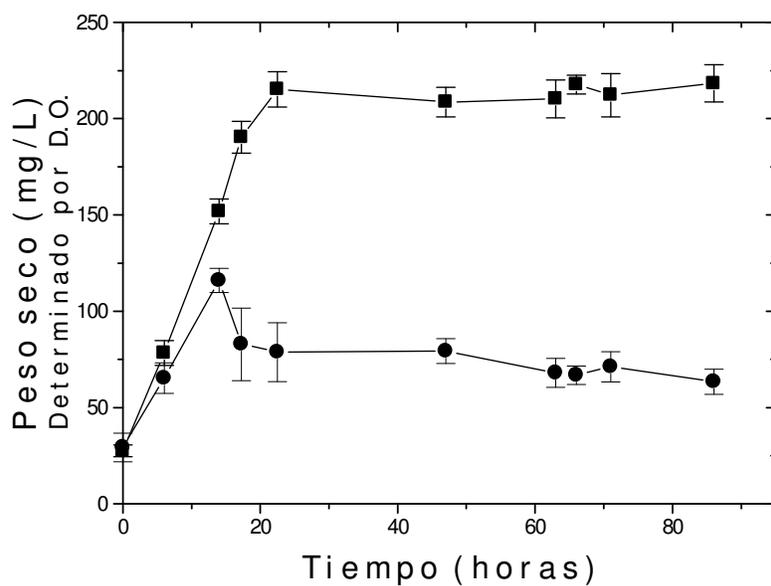


Figura 10. Crecimiento *in vitro* de la cepa M113 bajo condiciones óxicas. Empleando 1 g/L de glucosa (-■-) y 300 mg/L de LAS (-●-), como fuentes de carbono. Los resultados son el promedio de 4 experimentos.

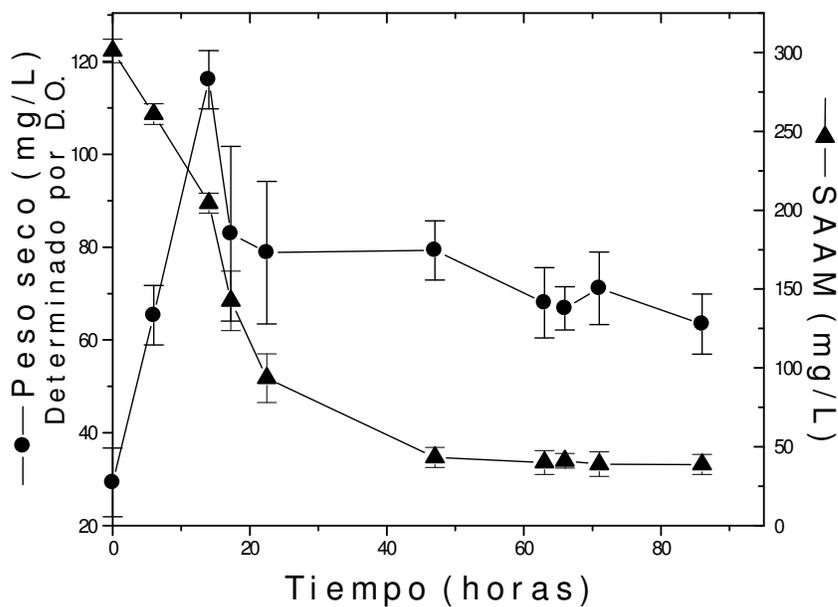


Figura 11. Evolución del LAS (-▲-), determinado como valor residual de las sustancias activas al azul de metileno y crecimiento *in vitro* de la cepa M113 (-●-) bajo condiciones óxicas. Concentración inicial de LAS 0.3 g/L. Los resultados son el promedio de 4 experimentos.

A las 47 horas la cepa M113 consumió el 81.2% de los 0.3 g/L del LAS (figura 11). El mayor consumo del tensoactivo se registró durante las primeras 20 horas del cultivo, tiempo en el que se registra el mayor incremento de biomasa.

El desarrollo de la cepa M113 bajo condiciones anóxicas, empleando NO_3^- como aceptor de electrones, se muestra en la figura 12. La producción máxima de biomasa usando glucosa como fuente de carbono fue el 50% (106.7 mg/L) del obtenido bajo condiciones óxicas, aunque el rendimiento global (Y) es muy parecido (0.37 y 0.41 g biomasa/g sustrato respectivamente). Para el ensayo donde se usó al LAS como fuente de carbono, se obtuvo un 30% más biomasa (151.2 mg/L) en condiciones anóxicas; además su rendimiento global fue 44% mayor que en el cultivo óxico (tabla 4).

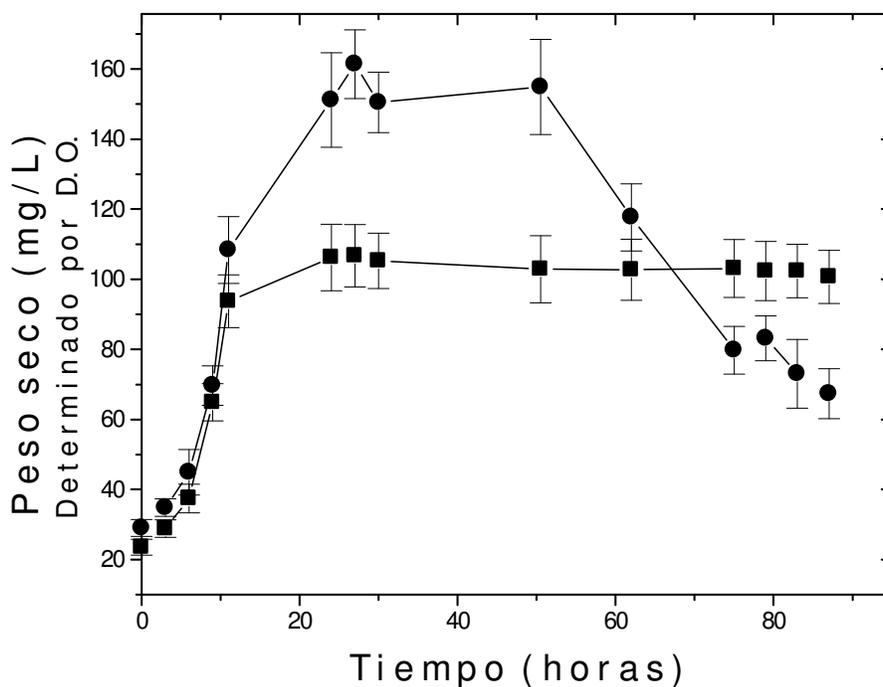


Figura 12. Crecimiento *in vitro* de la cepa M113 bajo condiciones anóxicas. Empleando 1 g/L de glucosa (-■-) y 0.3 g/L de LAS (-●-) como fuentes de carbono. Ambos cultivos fueron adicionados con 1.37 g $\text{NO}_3^-/\text{g C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ y 2.88 g $\text{NO}_3^-/\text{g LAS}$, respectivamente (ver sección 4.12). Los resultados son el promedio de 3 experimentos.

En la tabla 4 se muestran los cálculos cinéticos de la velocidad específica de crecimiento (μ) y del coeficiente específico de crecimiento (Y) para la cepa

M113 empleando glucosa (1 g/L) y LAS (0.3 g/L) como fuentes de carbono bajo condiciones óxicas y anóxicas; así como la tasa de decaimiento (d) para los cultivos anóxicos (Sólo adicionando LAS). En presencia de oxígeno, la cepa M113 tiene una μ mayor con glucosa (0.12 h^{-1}) que con LAS (0.097 h^{-1}). Por el contrario, cuando se desarrolla bajo condiciones anóxicas la μ es superior con tensoactivo (0.068 h^{-1}) que con glucosa (0.059 h^{-1}).

Con la adición de LAS al medio de cultivo, se presentó una disminución en la concentración celular (figuras 10 y 12). En el cultivo anóxico la tasa de decaimiento ($d = 0.0228 \text{ h}^{-1}$) es más pronunciada en una orden de magnitud con respecto al cultivo óxico ($d = 0.0033 \text{ h}^{-1}$); es decir la velocidad de muerte es superior bajo condiciones anóxicas (tabla 4). Durante la etapa de decaimiento el consumo de sustrato disminuyó hasta que la población detuvo el consumo de sustrato. La posibilidad de que ocurra una lisis celular o una disminución del tamaño celular se discute en la siguiente sección.

Tabla 4 Constantes cinéticas de la cepa M113 cultivada bajo condiciones óxicas y anóxicas con dos diferentes fuentes de carbono: glucosa 1 g/L y LAS 300 mg/L.

	Óxico		Anóxico	
	Glucosa	LAS	Glucosa	LAS
$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.12	0.097	0.059	0.068
$Y \text{ g biomasa / g sustrato}$	0.41	0.9	0.37	1.0
$d \text{ (h}^{-1}\text{)}$	-	0.0037	-	0.0228

Como se aprecia en la figura 13, con la adición de NO_3^- , la cepa M113 eliminó el 80% de los 0.3 g/L del LAS (entre las 80-90 horas); y al igual que bajo condiciones óxicas, la mayor degradación del tensoactivo coincidió con la fase exponencial del cultivo. Con oxígeno en el medio, la μ de la cepa M113 es superior con glucosa; mientras que, bajo condiciones anóxicas la μ con tensoactivo es mayor (tabla 4). Estos resultados sugieren que el uso del LAS se encuentra asociado directamente al crecimiento celular.

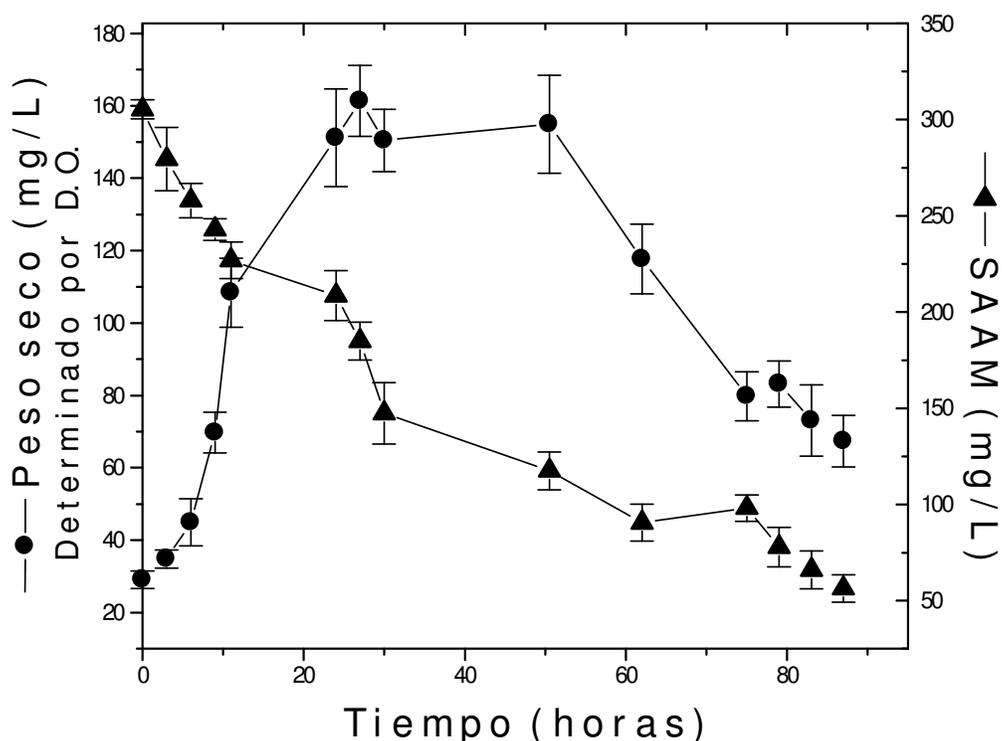


Figura 13. Evolución del LAS (-▲-) y crecimiento *in vitro* de la cepa M113 (-●-) bajo condiciones anóxicas. Concentración inicial de LAS 0.3 g/L y de NO_3^- 1.86 g/L. Los resultados son el promedio de 3 experimentos.

La mayor velocidad de consumo del LAS bajo condiciones anóxicas, muestra que la cepa M113 posee el potencial para mineralizar el tensoactivo de forma efectiva cuando se encuentran nitratos presentes en el medio. Schink (1988) reportó que empleando reacciones metabólicas diferentes, las bacterias desnitrificantes son capaces de degradar ciertos compuestos de forma más efectiva que con las reacciones empleadas bajo condiciones óxicas.

La bacteria alcanzó su máxima concentración de biomasa a las 22 horas y durante 30 horas se mantuvo en fase estacionaria. Sin embargo, y a diferencia del cultivo óxico, se presentó una abrupta caída en la concentración celular. Las causas probables de este fenómeno se abordan con más detalle en la siguiente sección.

5.2 DISMINUCIÓN APARENTE DE LA BIOMASA DE LA CEPA M113

Como se mencionó en la sección anterior, los cultivos anóxicos de la cepa M113, en los cuales se adicionó LAS como única fuente de carbono y NO_3^- como aceptor de electrones, presentan una caída en su densidad óptica (expresada como mg/L de peso seco) alrededor de las 60 horas. Las causas probables pueden ser variadas. Gloxhuber y Künstler (1992) mencionan que la lisis celular puede ser una de ellas, ya que tal efecto puede ser el resultado del daño ocasionado por la alta concentración del tensoactivo (300 mg/L). Sin embargo, la *Pseudomonas aeruginosa* usada en este trabajo es resistente a las altas concentraciones empleadas. Como se observa en la figura 13, cuando se registró la disminución del peso seco, medida como densidad óptica (aproximadamente a las 60 horas), la concentración residual del LAS, determinado como SAAM, fue de 0.1 g/L, es decir, ya se había consumido una tercera parte del tensoactivo. Además, hasta las 90 horas de la cinética se registró un consumo del LAS. Finalmente, esta posibilidad fue descartada cuando se tomaron algunas microfotografías de la bacteria desarrollándose bajo ambas condiciones (figura 14).

La otra posibilidad que se exploró fue la disminución en el tamaño celular de la bacteria. Pero, ¿qué causa la disminución celular? Actualmente no es muy claro cuales son los mecanismos que intervienen en la disminución de tamaño celular que sufren las bacterias, pero algunos de los factores asociados a tal reducción son la limitación de nutrimentos, tanto de los minerales como los de las fuentes de carbono, y/o a la exposición a compuestos tóxicos (Colbert *et al.*, 1993, Givskov *et al.*, 1994 y Haack *et al.*, 1995).

Tal vez la herramienta más simple para determinar el estado fisiológico de las bacterias introducidas a un ecosistema sea la observación directa de las variaciones morfológicas de las células (longitud principalmente) por microscopía, en combinación con un análisis de imágenes (Bloem *et al.*, 1995).

Una serie de artículos publicados por varios autores han demostrado ampliamente que hay una reducción del tamaño celular cuando los

microorganismos se someten a algún tipo de estrés (van Veen *et al.*, 1997). Por ejemplo, las células de *Vibrio spp.* disminuyen su tamaño cuando se exponen a condiciones oligotróficas en sistemas acuáticos (Kjelleberg *et al.*, 1983). A este respecto Holmquist y Kjelleberg (1993) observaron una disminución de la longitud celular durante la incubación en un medio bajo en nutrientes; lo cual resalta la importancia de la oligotrofia más que de los factores ambientales para que se presente el fenómeno. La reducción del tamaño celular de las bacterias puede verse entonces como una respuesta de adaptación al estrés nutritivo y generalmente las bacterias gram-negativas, como la cepa M113, son las más susceptibles a presentarlo.

Para corroborar si la cepa M113 presentó una disminución en el tamaño celular durante su cultivo con el tensoactivo, se tomaron microfotografías de la bacteria cultivada con el tensoactivo y con glucosa (como control). Se eligió para la toma de muestra las 70 horas de cultivo, debido a que en este tiempo se registró una marcada disminución de la densidad óptica en el cultivo adicionado con el tensoactivo, mientras que en el cultivo suplementado con glucosa permaneció constante (figura 12). Para ambos cultivos, con glucosa (figuras 14 A y C) y con LAS (figuras 14 B y D), se determinó un tamaño promedio de 1.4 ± 0.15 μm de diámetro por 3.6 ± 0.15 μm de largo, con lo que se descartó la posibilidad de una disminución del tamaño celular ocasionada por el tensoactivo. Como se mencionó anteriormente tampoco se encontró evidencia de que ocurriera lisis celular.

Durante el cultivo *in vitro* de la cepa M113, adicionado con LAS, se produjo una agregación blanquecina, mientras que en el cultivo suplementado con glucosa no se formó (figura 15). A este respecto Marchesi *et al.* (1994) sugieren la hipótesis de que el 1-dodecanol, uno de los primeros productos detectados durante la biodegradación de un tensoactivo del tipo LAS, es el responsable de la formación de un exopolímero. Lo notable es que tal sustancia, promueve la adhesión de dos diferentes cepas de *Pseudomonas* en sedimentos de la superficie de río (a nivel microcosmos).

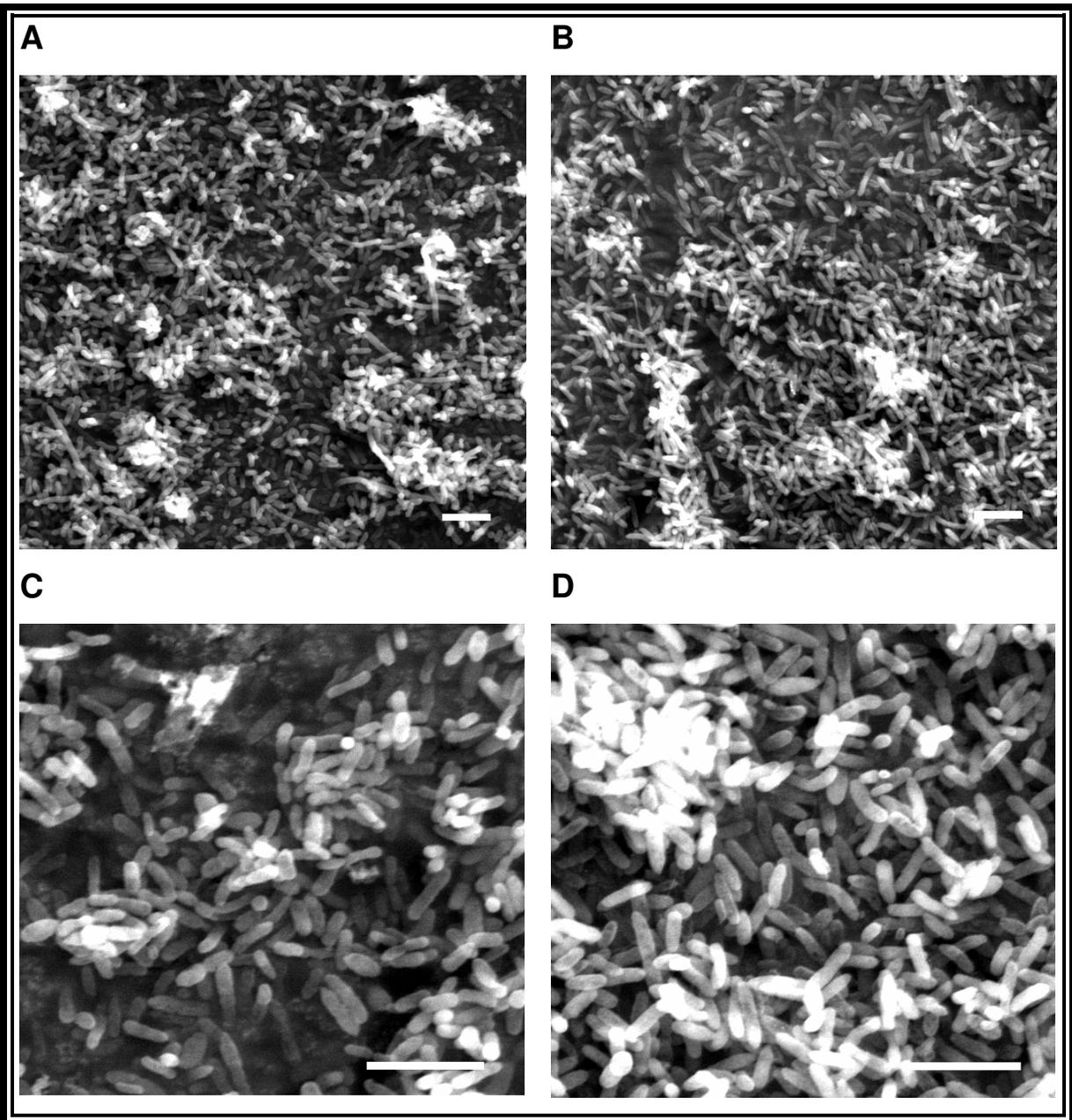


Figura 14. Microfotografías de la *P. aeruginosa* (M113), cultivada con 1g/L de glucosa (A y C) y 0.3 g/L de LAS (B y D) como fuentes únicas de carbono. A y B 2000 X, 20KV. C y D 5000 X, 20KV. Longitud de la barra 5 µm.

Se puede suponer que la adhesión de las bacterias dentro del exopolímero es la causa de la subestimación de la concentración celular. Recordemos que para efectos prácticos se empleó la densidad óptica para estimar la biomasa, con

la generación previa de una curva de calibración (sección 4.3). Como resultado de la aglutinación, la concentración disminuía en apariencia dentro del medio de cultivo, pero las bacterias continuaban consumiendo el LAS.

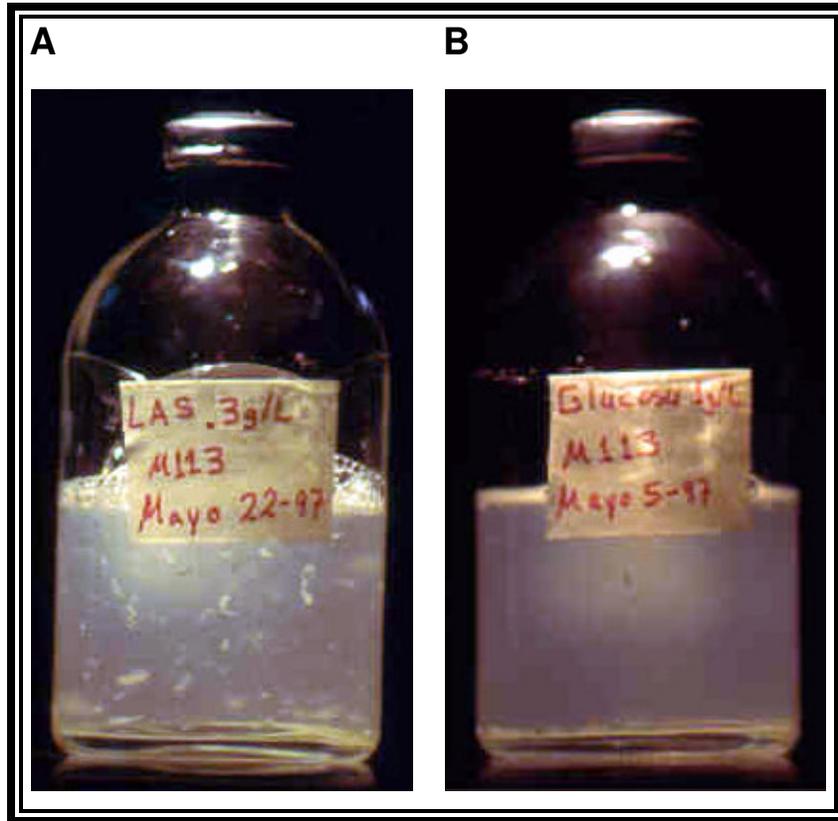


Figura 15. Cultivo *in vitro* de la cepa M113 a las 70 horas. 0.3 g/L de LAS (A). 1g/L de glucosa (B).

El hecho de que la cepa M113 produzca este exopolímero tiene una gran ventaja ya que existe la posibilidad de que la bacteria pueda aumentar su estabilidad ecológica dentro del sistema de tratamiento de aguas residuales. Después de la bioaumentación comúnmente se presenta una disminución significativa de las bacterias inoculadas, debido a que el sistema recibe un aporte continuo de agua. Este flujo “remueve” a las bacterias inoculadas porque no tienen suficiente tiempo para integrarse a los gránulos de los lodos activados. La capacidad de adhesión de la cepa M113 (otorgada por el exopolímero) le confiere una ventaja de adaptación; pues se considera que dentro del reactor acidogénico

podría prosperar eficientemente, al incorporarse en mayor número a los gránulos. Una vez integrada al microcosmos de los lodos activados, la *Pseudomonas aeruginosa* podría iniciar la degradación del tensoactivo, para que posteriormente la comunidad bacteriana pueda usar los productos resultantes de tal degradación.

5.3 PRODUCTOS DE LA DEGRADACIÓN DEL LAS POR LA CEPA M113

Con el fin de conocer cuáles son los primeros productos del catabolismo del LAS por la cepa M113 bajo condiciones anóxicas y teniendo como antecedente la formación del 1-dodecanol, se realizó una cromatografía de gases acoplada a masas (CG/MS). Las condiciones experimentales son las mismas que las ensayadas para las cinéticas de crecimiento de la cepa M113: LAS (0.3 g/L) como fuente de carbono y NO_3^- (2.88 g/L) como aceptor de electrones. La muestra analizada se tomó a las 70 horas de iniciado el cultivo (ver figura 13).

El cromatograma obtenido (figura 16) muestra los principales productos de la degradación del LAS. Los picos marcados del 3 al 8 fueron identificados por su espectro de masas como ácido 1,2-bencendicarboxílico y los picos 9 a 18 (con excepción del pico 13, que fue identificado como hexadecanol) como 2,6,10-dodecatrien-1-ol (En el anexo III se muestran en detalle los picos y los espectros de masas de ambas moléculas). La razón por la que se detectaron varios picos de la misma molécula es que el tensoactivo empleado en este estudio es comercial (ver formulación en el anexo I) y en su composición se encuentran presentes varios isómeros del LAS. Por ello los picos detectados son considerados como isómeros del ácido 1,2-bencendicarboxílico y del 2,6,10-dodecatrienol respectivamente.

Debido a que no se detectó el grupo sulfonato en la muestra analizada (que fue tomada a las 70 horas de iniciado el cultivo); se piensa que es posible que en la degradación del LAS por la cepa M113, la desulfonación sea el primer paso del proceso, para posteriormente permitir la degradación de la cadena alquílica, que en otras cepas se da regularmente antes de la escisión del anillo aromático. Esto

coincide con lo reportado para la degradación del BAS por la cepa parental W51D (Campos-García *et al.*, 1999).

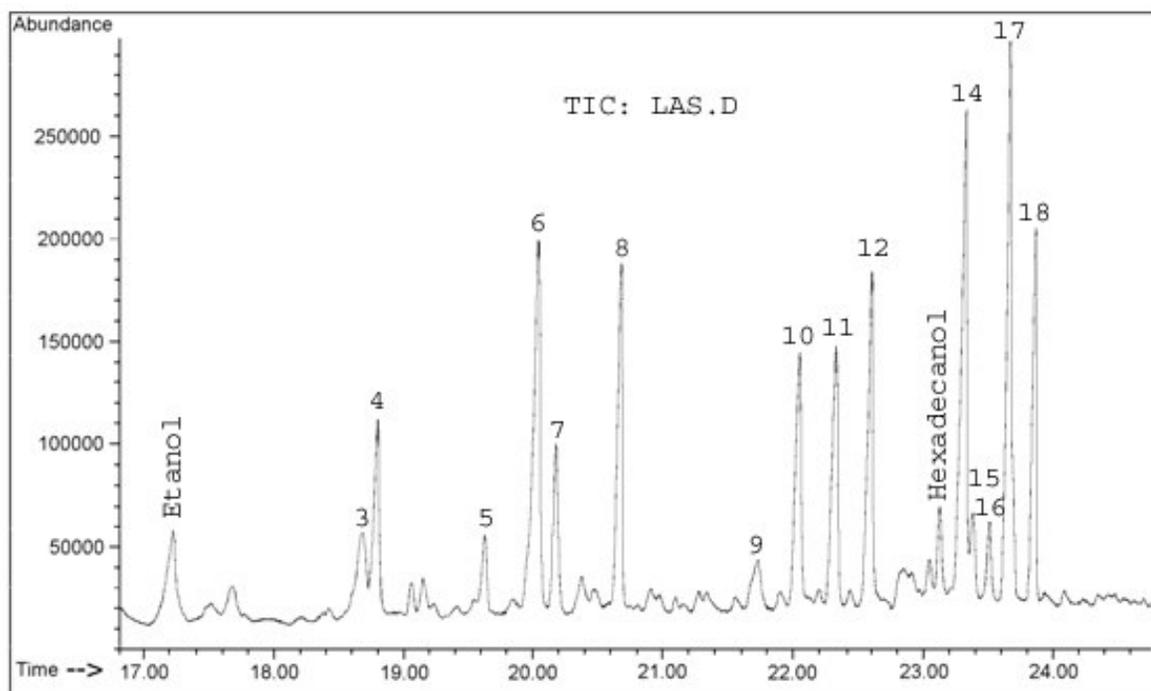


Figura 16. Cromatograma de gases de los productos de la degradación del LAS por la cepa M113 cultivada *in vitro* bajo condiciones anóxicas a las 70 horas (ver Materiales y Métodos). Picos 3 - 8, ácido 1,2-bencendicarboxílico; picos 9 - 18, 2,6,10-dodecatrienol.

El 2,6,10-dodecatrienol, puede ser la molécula precursora para la síntesis del polímero excretado por la cepa M113. Como se mencionó, algunas *Pseudomonas* son capaces de sintetizar tal sustancia cuando se cultivan con LAS (Marchesi *et al.*, 1994). Por otro lado, el 2,6,10-dodecatrienol puede ser el primer producto del ataque inicial a la molécula, realizado por la vía de la ω -oxidación. Este alcohol se oxida para formar el ácido graso correspondiente que muy posiblemente es metabolizado por medio de la vía de la β -oxidación.

La otra molécula detectada, el ácido 1,2-bencendicarboxílico, es uno de los intermediarios reportados en la degradación anóxica de los tensoactivos tipo LAS. En sistemas anóxicos y vía hidrogenación, se puede obtener un ácido bencencarboxílico (Evans, 1977). Este compuesto puede tener varios destinos

dependiendo de las bacterias presentes en el sistema. Se puede descarboxilar resultando un ácido caprónico, el cual mediante β -oxidación produce tres moléculas de acetato (Shlomi *et al.*, 1978); o se pueden obtener compuestos tales como butirato, succinato, propanoil CoA, butiril CoA, acetil CoA ó CO₂, todos ellos por vías anóxicas (UM-BBD, 2000).

El primer ataque a la molécula del LAS es el más complicado, son pocas las bacterias que poseen las enzimas necesarias para realizarlo. Como se mencionó anteriormente la cepa M113 (y su cepa parental W51D, Campos-García *et al.*, 1999) es capaz de realizar estas transformaciones metabólicas y dar como primeros productos de la degradación del LAS tres moléculas: el 2,6,10-dodecatrienol, el ácido 1,2-bencendicarboxílico y el grupo sulfonato (no detectado en este estudio).

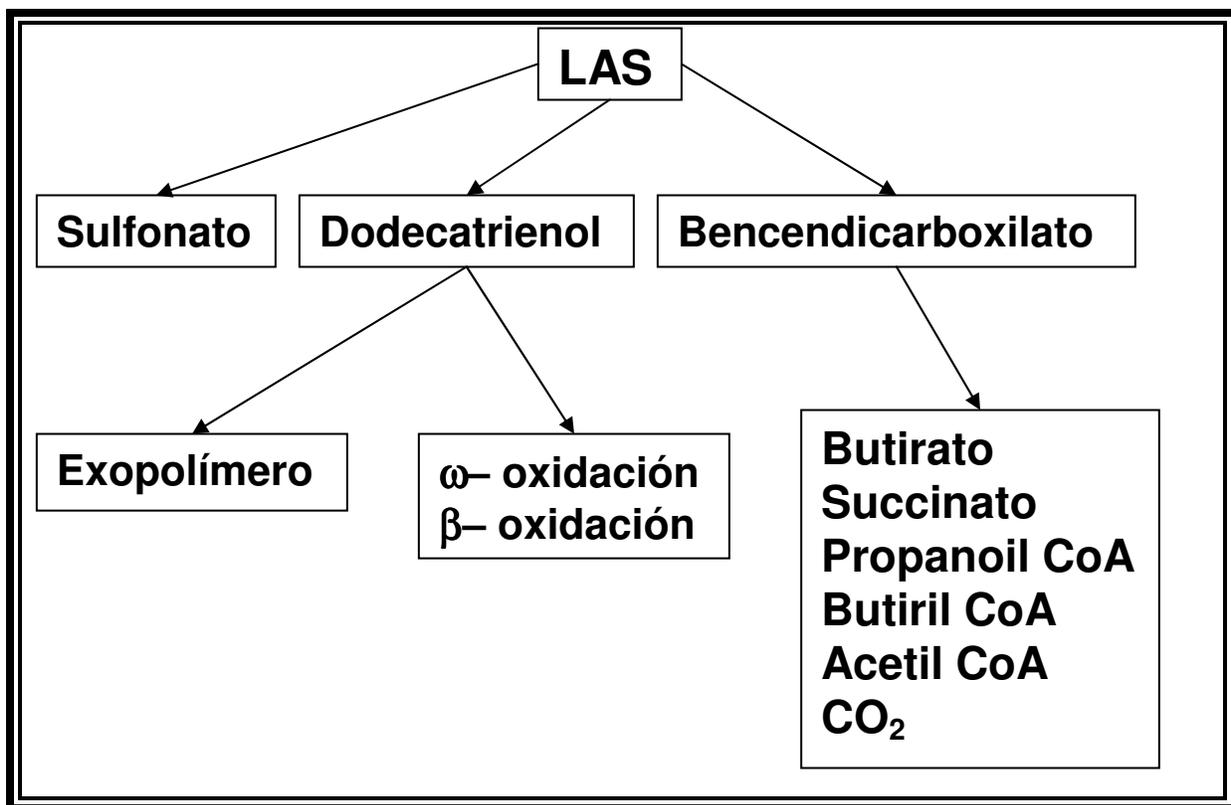


Figura 17. Posibles destinos de los productos de la degradación del LAS por la cepa M113.

Estos tres compuestos pueden ser empleados por la misma bacteria, como en el caso del 2,6,10-dodecatrienol que posiblemente es usado para la síntesis del exopolímero observado; o pueden ser usados por otros microorganismos presentes en el consorcio del gránulo acidogénico o inclusive por la microbiota del reactor metanogénico (figura 17).

5.4 BIOAUMENTACIÓN DEL RA CON LA CEPA M113

Uno de los aspectos fundamentales de esta tesis fue evaluar la capacidad de integración de la cepa M113 a los gránulos acidogénicos, relacionándola con su eficiencia para degradar el LAS dentro del RA. El experimento preliminar que se describió en los antecedentes muestra que sin la cepa M113, el sistema en dos etapas absorbe una gran concentración del tensoactivo y no es capaz de degradarlo, sufriendo una caída en la capacidad de remoción de la DQO (García *et al.*, 1998).

Swisher (1987) menciona que en ocasiones se registra un incremento en la concentración de tensoactivo en el medio, después de una disminución inicial de éste durante la biodegradación (como la desorción detectada en las etapas II y III); este efecto lo ocasiona la muerte de las bacterias que liberan el compuesto absorbido hacia la solución. Tal fenómeno se puede atribuir a la gran absorción promovida por las fuertes interacciones que establecen con las proteínas. Además, el hecho de que el RA trabaja a valores promedio de pH 5, incrementa la absorción del tensoactivo por los lodos acidogénicos (Yoshimura, 1984).

5.4.1 Integración de la cepa M113 a los lodos del reactor acidogénico.

Después de la experiencia mencionada, se procedió a inocular a la cepa M113 en el RA. Se adicionaron 250 mL de cultivo (que se encontraba en la fase exponencial de crecimiento) con una concentración de 4.6×10^8 UFC/mL. El experimento constó de tres fases (figura 18); en la primera los reactores se alimentaron con 1 g/L de lactosa como única fuente de carbono, para permitir que

el tensoactivo absorbido en el experimento anterior se “lavará” del sistema. Como la bacteria adicionada sólo emplea al tensoactivo como fuente de carbono se esperó que la concentración del LAS disminuyera en el sistema.

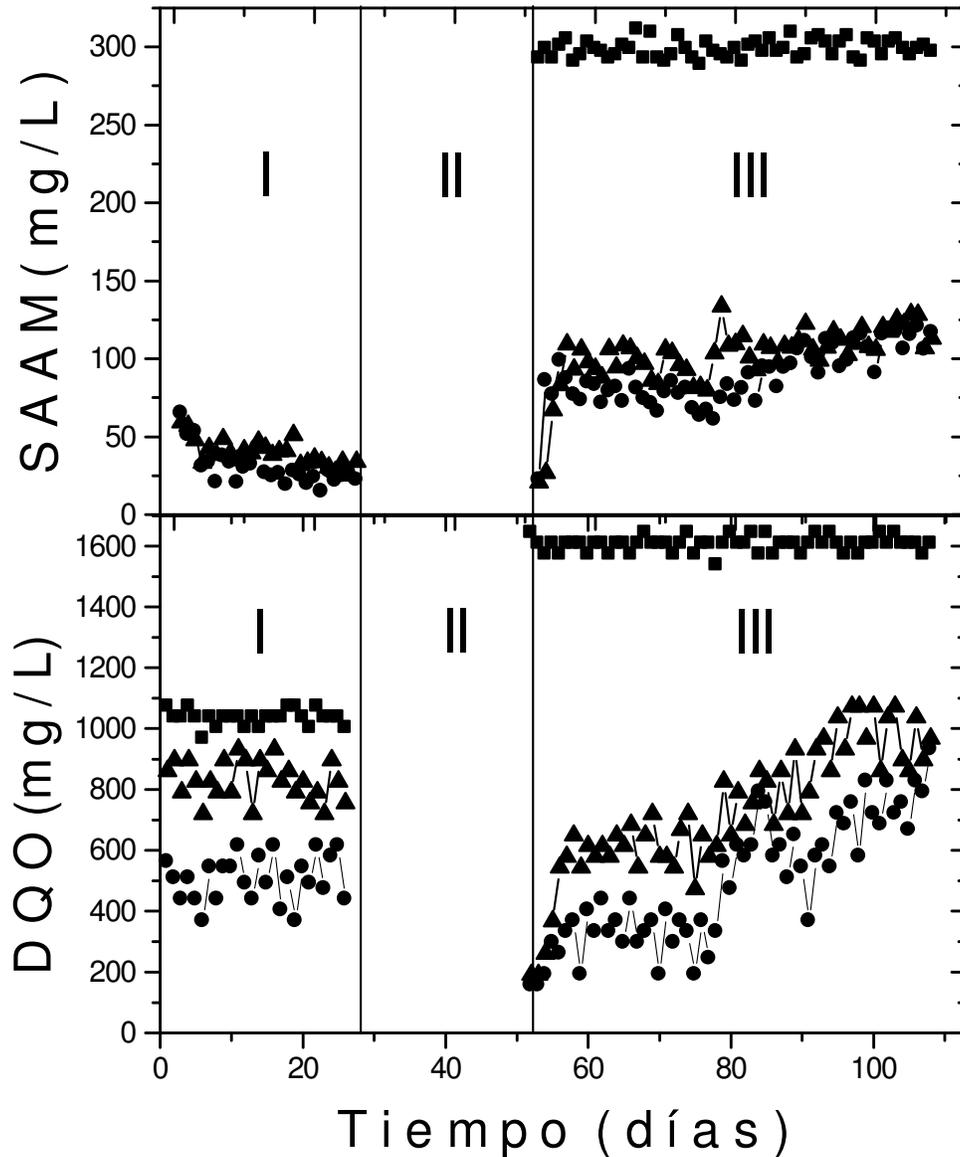


Figura 18. Comportamiento de LAS (como SAAM) y de la DQO en el RA y el RM; tras la inoculación de la cepa M113. (-■- Entrada RA; -▲- Salida RA y -●- Salida RM). Se marcan 3 fases: I, alimentación de 1g/L de lactosa; II, sin alimentación; y III, alimentación con 1g/L de lactosa y 300 mg/L de LAS.

En el efluente se detectó el LAS administrado en el experimento anterior; pero se apreció una recuperación de la actividad metanogénica más acelerada respecto del experimento descrito por García *et al.*, 1998 (27 días). Junto con el restablecimiento de la metanogénesis, se registró la desorción del tensoactivo en un menor tiempo. Esta reducción se atribuyó a la capacidad de la cepa M113 para degradar al tensoactivo. De tal forma que en esta ocasión no sólo se lavó el tensoactivo, sino que parte de él fue presumiblemente metabolizado por la bacteria inoculada.

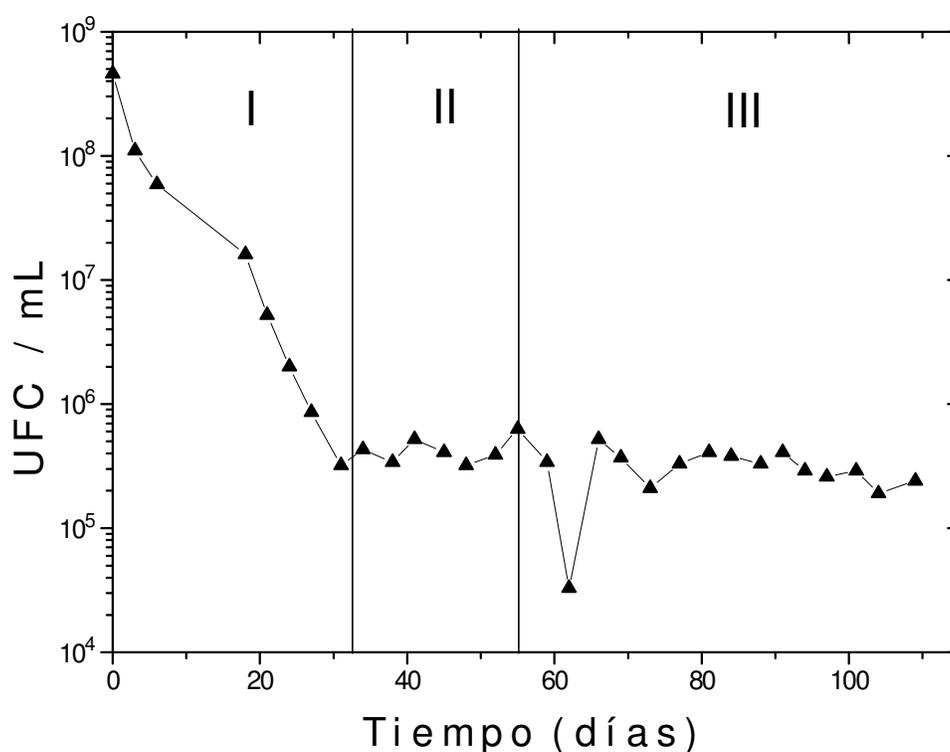


Figura 19. Supervivencia de la cepa M113 en el reactor acidogénico. Se marcan 3 etapas: I, alimentación de 1g/L de lactosa; II, sin alimentación y III, alimentación con 1g/L de lactosa y 300 mg/L de LAS.

A pesar de la recuperación del sistema de remoción, se advirtió una rápida disminución en el número de UFC/mL de la bacteria incorporada (figura 19, fase I). Este fenómeno era de esperarse, ya que siempre se registra una disminución

significativa de la cuenta bacteriana tras la bioaumentación en el sistema. De hecho, una de las mayores desventajas de la tecnología de la bioaumentación es la rápida disminución de la población al introducirse en el ecosistema blanco. Esto incrementa la preocupación existente acerca del gran potencial práctico que ofrece la liberación de microorganismos al ambiente con fines de biorremediación. En el caso particular, se puede inferir que el flujo continuo de agua residual arrastró a las bacterias que no se habían logrado integrar a los gránulos.

Pero entonces, ¿Se está integrando la cepa M113 al sistema?, y de no ser así ¿Cuáles son las razones por las que no logra mantenerse dentro de él? Antes de contestar la primera pregunta a continuación se discuten los factores que intervienen en la integración de un microorganismo dentro del sistema de tratamiento de aguas. En general son tres los factores que inciden en la integración de un microorganismo en los gránulos: la densidad de la población inoculada, su capacidad de integración en los gránulos y su tasa de reproducción.

La concentración de células inoculadas no determina la eficiencia de remoción del compuesto xenobiótico, pero sí la capacidad del microorganismo de permanecer en el sistema (McClure *et al.*, 1989; Fujita *et al.*, 1991 y Fujita *et al.*, 1994).

El nivel efectivo de densidad y actividad de los microorganismos introducidos depende, por supuesto, de las condiciones ecológicas requeridas por la aplicación. Cuando los microorganismos introducidos se involucran en un proceso que les ofrece una ventaja selectiva en el sistema (nutricional o espacialmente protectora), únicamente es necesario un número mínimo de células activas iniciales para el éxito del proceso. De tal forma que, cuando se desea la mineralización de un compuesto xenobiótico que es abundante en el sistema y sólo el o los microorganismos introducidos pueden producir las enzimas necesarias para utilizar tal molécula como fuente de energía, se requiere un bajo número de microorganismos iniciales (van Veen *et al.*, 1997).

Sin embargo, cuando es improbable que ocurra una selectividad ecológica, se requiere inocular grandes concentraciones de células activas para que el proceso sea exitoso. Este último, es el caso más común con que se enfrenta el

proceso de bioaumentación, en el cual se involucran los fenómenos de competencia por sustratos y nichos ecológicos específicos, depredación, resistencia a antibióticos, efecto de inhibidores y tóxicos, o una combinación de algunos o todos los anteriores (van Veen *et al.*, 1997).

Tal vez el factor determinante en la bioaumentación es la capacidad de integración del microorganismo al sistema, es decir, la ocupación de un nicho definido que le ofrezca una ventaja espacialmente protectora contra microorganismos antagonistas. Flint (1987) reportó que en presencia de la microbiota natural de aguas residuales y de río, una población de *E. coli* introducida declina rápidamente, debido a que la bacteria no se adhiere a los diferentes sustratos. En términos ecológicos significa que la bacteria no tiene la capacidad de invadir un nicho para establecerse en el ecosistema.

Una vez que el microorganismo se ha establecido en el ecosistema, éste debe tener una tasa de reproducción constante, de lo contrario, terminará por ser desplazado del sistema. La gran parte de los microorganismos introducidos en un ecosistema blanco presentan un estado de letargo reproductivo conocido como “viable pero no cultivable”. En ésta fase los microorganismos se desarrollan normalmente pero detienen su metabolismo reproductivo. Las razones o causas que obligan a adoptar tal estrategia a los microorganismos introducidos son desconocidas (Brock y Madigan, 1993).

A pesar de no encontrarse en una fase de reproducción activa, los microorganismos pueden jugar un papel relevante en el proceso de la conversión de nutrientes y en la degradación de xenobióticos. Sin embargo, si no entran en fase reproductiva corren el riesgo de desaparecer rápidamente del sistema; lo que conlleva a la pérdida de la capacidad de eliminación del compuesto de interés.

Aunque la cepa M113 es una bacteria que tiene algunas de las ventajas antes mencionadas para integrarse con éxito a los gránulos acidogénicos, resultó que alrededor de los 25 días de haberla inoculado al RA su concentración celular había disminuido en tres órdenes de magnitud. Contestando la primer pregunta, tenemos que apuntar a que la bacteria no se estaba integrando al sistema.

Ya que el factor determinante de la bioaumentación es la integración de la bacteria en el sistema, se decidió detener la alimentación del sistema por un periodo de 25 días, con el propósito de promover la invasión de un nicho por la cepa M113 (figura 18, fase II).

Como apunta Garcia (1990) el género *Pseudomonas* es uno de los más comunes en los lodos, las bacterias pertenecientes a este género ocupan un nicho en el ecosistema donde mantienen ciertas relaciones bióticas. Sin embargo, pueden acontecer cambios en los factores fisicoquímicos del ecosistema (abióticos) que promuevan alguna desventaja o ventaja selectiva a los microorganismos introducidos.

La cepa M113 es una *P. aeruginosa* tiene las características de las bacterias de su género, pero además, posee dos claras ventajas sobre el resto de los microorganismos del reactor acidogénico: 1) emplea preferentemente el LAS como fuente de carbono, lo que le ofrece una ventaja selectiva nutricional y 2) a partir del tensoactivo, la bacteria es capaz de sintetizar un exopolímero presumiblemente derivado del 2,6,10-dodecatrienol (sección 5.3) que se asocia con su adhesión a los gránulos acidogénicos dotándola de una ventaja espacialmente protectora (Marchesi *et al.*, 1994). Ambas características se asociaron en la estabilización de la cuenta bacteriana dentro del RA. Los valores del número celular durante la segunda fase se mantuvieron alrededor de las 10^5 UFC/mL (figura 19, fase II).

La alimentación se reanudó nuevamente a los 51 días. En esta ocasión se adicionaron 1 g/L de lactosa y 0.3 g/L de LAS (figura 18, fase III). La densidad de la bacteria durante esta fase fluctuó en el orden de magnitud de 10^5 UFC/mL, igual que en el tiempo en el que se suspendió la alimentación del sistema, manteniendo esta cuenta por el resto del experimento. La cepa M113 sobrevivió en el reactor acidogénico en presencia de una microbiota heterogénea por más de 117 días (figura 19), y probablemente, se incorporó a los flóculos de los lodos activados. Este hecho es relevante, si se asocia con la biodegradación del LAS.

5.4.2 Remoción de la DQO y del LAS.

El inicio de la tercer fase (día 51) está marcado por la adición de 0.3 g/L de LAS. Durante los primeros días de operación se registró una remoción del tensoactivo del 66% dentro del RA. Por su parte, y al igual que en el experimento preliminar, el RM no fue capaz de degradar el LAS. El sistema removió el 81% de la DQO, la mayor parte de ésta (62%) tuvo lugar en el RA, y el restante (19%) en el RM (figura 18, fase III).

A los 80 días de operación se registró una ligera disminución de la eficiencia de remoción del LAS en el RA (se consumió el 59%). Ello se reflejó en el incremento de la concentración de LAS en el efluente de salida del RM. En contraste, durante este periodo la eficiencia de remoción de la DQO cayó al 37% en el RA; como consecuencia se apreció una disminución en la eficiencia de eliminación de la DQO por el sistema en dos etapas (figura 18).

Un análisis de la concentración de LAS absorbido por los lodos de los reactores acidogénico y metanogénico mostró que, durante la fase I (cuando el sistema se alimentó solamente con lactosa como fuente de carbono), ambos lodos liberaron gradualmente el LAS que habían adsorbido en el experimento preliminar (García *et al.*, 1998). En la segunda fase (con el sistema detenido), la concentración detectada del tensoactivo en ambos lodos continuó disminuyendo. Al encontrarse detenida la circulación, esta disminución en la concentración del tensoactivo se atribuyó a la degradación del mismo por la bacteria inoculada. Al comenzar a suplementar el sistema con el tensoactivo (fase III), se detectó una acumulación del LAS en los lodos del RM. En cambio, el RA no acumuló una cantidad apreciable de éste durante el tiempo restante de experimentación (figura 20).

Estos resultados muestran que el RA degrada una concentración significativa del LAS (alrededor del 65% de los 0.3 g/L adicionados). Sin embargo, la cantidad del tensoactivo removida del agua residual no es suficiente, ya que el LAS restante intoxicó a la microbiota de ambos reactores, hecho que se refleja en

la pobre eliminación de la DQO y en la creciente acumulación del tensoactivo en los lodos del RM.

Las bacterias metanogénicas y en general las responsables de la digestión anaerobia son afectadas negativamente por concentraciones de LAS superiores a los 200 mg/L; estos niveles son bajos comparados con las concentraciones de 25,000 a 50,000 mg/L que se estima se encuentran en los SV presentes en tales sistemas (Swisher, 1987). El umbral para un efecto adverso está entre los 15 y 20 mg tensoactivo/g SV, que quizás elevan la concentración total de tensoactivo (disuelto + absorbido) hasta valores de 0.5 a 1 g/L en el sistema (Swisher, 1987). Alrededor de estas concentraciones la inhibición del sistema es evidente, y se refleja en el decremento o el cese de la producción de biogas y la baja remoción de la DQO (Swisher, 1987). Este mismo efecto se registró al final de la tercera fase del experimento, donde la concentración del LAS en los lodos metanogénicos superaba aproximadamente seis veces el umbral de toxicidad reportado por Swisher (figura 18, fase III).

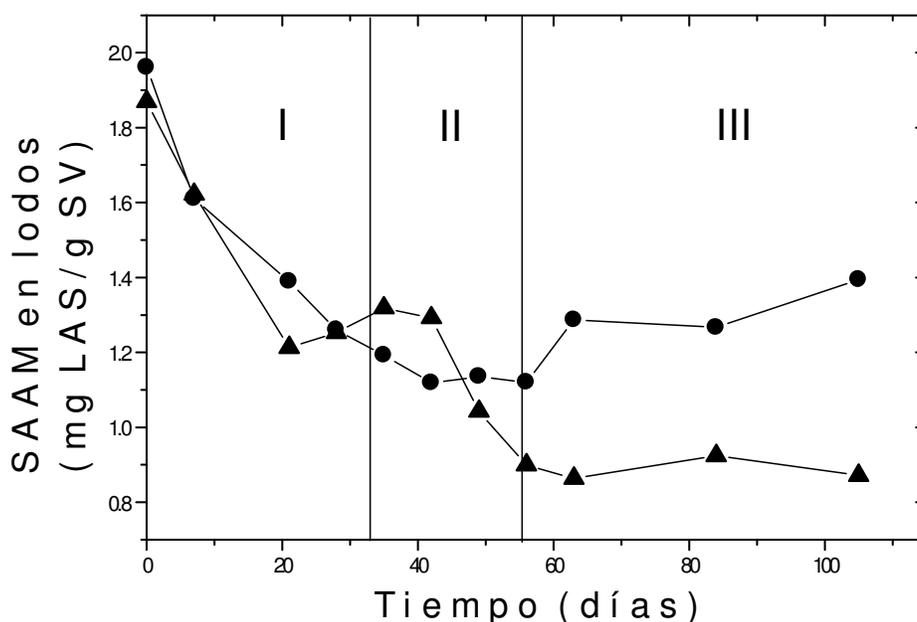


Figura 20. Acumulación de LAS en los lodos del RA (-▲-) y del RM (-●-). Se marcan 3 etapas: I, alimentación de 1g/L de lactosa; II, sin alimentación y III, alimentación con 1g/L de lactosa y 300 mg/L de LAS.

5.5 ADICIÓN DE NO_3^- AL SISTEMA DE DOS ETAPAS

Con los ensayos *in vitro*, se probó la capacidad de degradación del LAS por la cepa M113 bajo condiciones óxicas y anóxicas. Bajo esta última condición, las bacterias del género *Pseudomonas* necesitan forzosamente un aceptor de electrones para poder metabolizar las fuentes de carbono presentes.

Puesto que, dentro de un ecosistema, la mineralización de los compuestos es consecuencia de la asociación trófica entre los microorganismos, sólo se adicionó la concentración teórica necesaria de NO_3^- para llevar a cabo la degradación del anillo aromático y de la cadena alquílica de la molécula de LAS, hasta acetato.

En la figura 21 se muestra la remoción de las SAAM y de los niveles de la DQO, cuando se adicionó NO_3^- al medio a razón de 0.9 g NO_3^- /g LAS. Se observa que la eliminación de LAS alcanzó valores del 73% en el RA. Mientras que en el efluente de salida del RM se registró la misma cantidad de LAS que en su entrada, es decir no hay eliminación del tensoactivo. A pesar de presentar valores de remoción del tensoactivo aceptables, la remoción de la DQO cayó casi enseguida de iniciado el experimento. Durante los primeros dos días se eliminó del sistema el 88% de la DQO, pero súbitamente al tercer día la eliminación registrada fue del 56%, por el resto del experimento los valores fluctuaron alrededor de este valor.

La acumulación de LAS en los lodos fue semejante en los dos reactores (tabla 5). Como se observa, la concentración del LAS (en promedio alrededor de los 0.84 mg LAS/g SV) continúa estando cuatro veces arriba de la concentración reportada como el umbral tóxico para los lodos metanogénicos. A pesar, de que con la adición del NO_3^- al medio, la degradación del LAS en el RA es mayor, la acumulación del tensoactivo en los lodos de ambos reactores afectó negativamente el desempeño del sistema. De continuar con el experimento la concentración de LAS en los lodos se hubiera incrementado, ocasionando el eventual colapso del sistema.

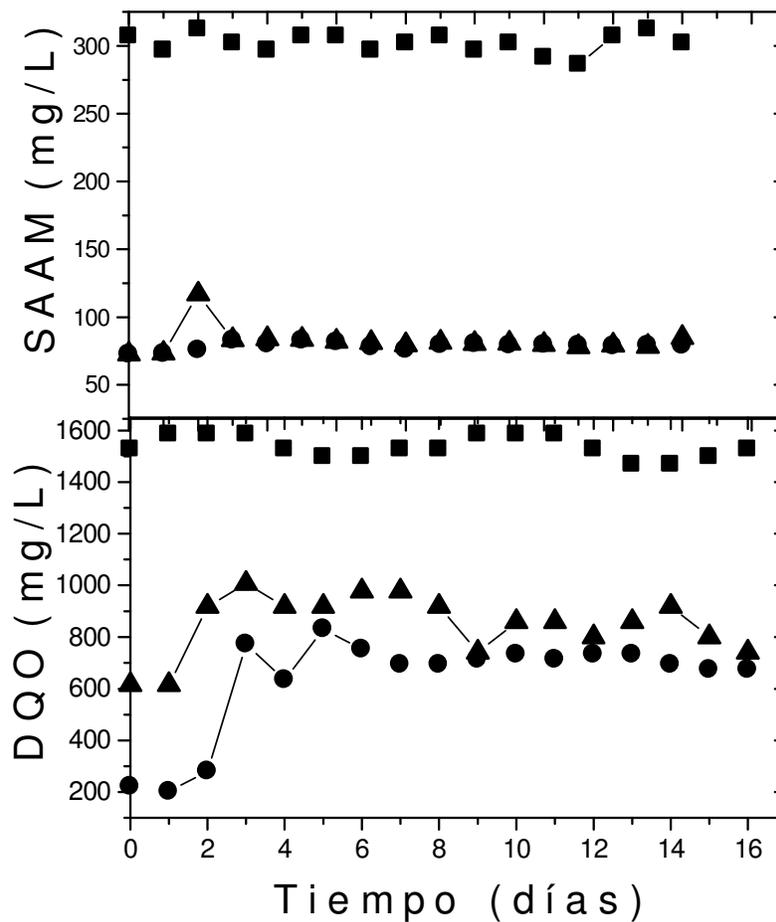


Figura 21. Comportamiento de LAS (como SAAM) y DQO en los reactores acidogénico y metanogénico; después de la inoculación de la cepa M113; adicionando el medio con 0.9 g NO_3^-/g LAS. (-■- Entrada RA; -▲- Salida RA y -●- Salida RM).

Tabla 5. Concentración de LAS en los lodos de los reactores acidogénico y metanogénico. El medio de alimentación se adicionó con 270 mg/L de NO_3^- . * Los valores están expresados en mg LAS/g SV.

Reactor	Días		
	1	8	16
Acidogénico	0.86*	0.84*	0.86*
Metanogénico	0.80*	0.86*	0.87*

Otro factor importante de monitorear es la concentración de NO_3^- en el sistema. Una concentración elevada de NO_3^- o de NO_2^- en el RM, fomentaría un desplazamiento de las bacterias metanogénicas por desnitrificantes; con la consecuente disminución del proceso metanogénico. Por esta razón se realizó el constante monitoreo de las concentraciones de NO_2^- y NO_3^- . Los 0.9 g NO_3^-/g LAS adicionados al sistema son empleados totalmente por las bacterias acidogénicas; como se observa en la figura 22 no se detectó la presencia de NO_3^- en el efluente del RA.

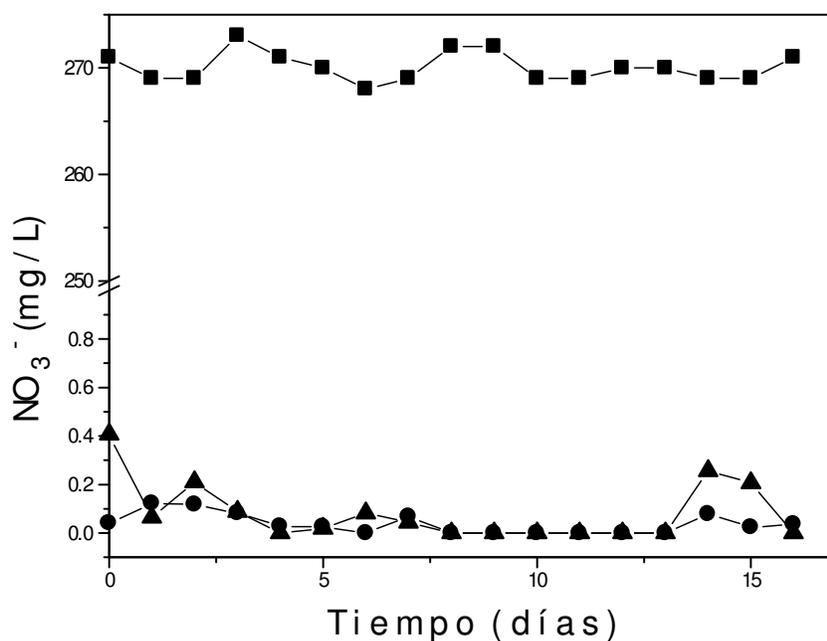


Figura 22. Consumo de NO_3^- (-■- Entrada RA; -▲- Salida RA y -●- Salida RM).

La adición de NO_3^- mejoró la remoción de las SAAM en el reactor acidogénico. En teoría la degradación del 73% del LAS debió consumir 255 g NO_3^- , pero el sistema consumió todo el NO_3^- adicionado. El restante pudo ser utilizado por la cepa M113 en otro proceso metabólico, o como se ha mencionado, otros de los microorganismos desnitrificantes presentes pudieron consumirlo.

Durante este experimento se monitoreó el número de bacterias de la cepa M113 presentes. A lo largo del ensayo se registraron alrededor de 10^3 UFC/mL (figura 23).

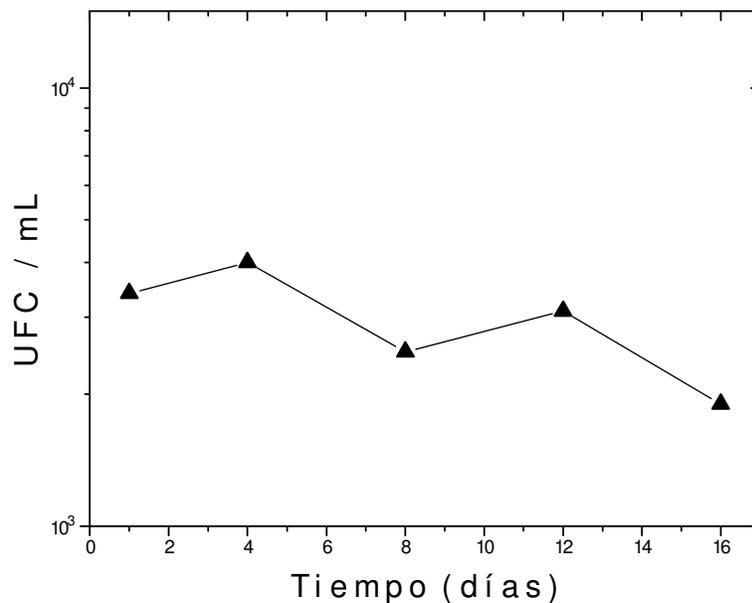


Figura 23. Supervivencia de la cepa M113 en el reactor acidogénico, cuando se adicionó el medio con 270 mg/L de NO_3^- .

En todos los experimentos se monitoreó la presencia de la cepa M113 o de algún otro microorganismo capaz de usar el LAS como única fuente de carbono (tabla 6). Se encontró a la *P. aeruginosa* (M113) únicamente en el reactor acidogénico o en el matraz de recirculación. No se detectó ningún microorganismo diferente a la cepa M113 que fuera capaz de desarrollarse con LAS como fuente única de carbono en cualquiera de los efluentes analizados.

La búsqueda constante de algún microorganismo, diferente a la cepa M113, capaz de utilizar el LAS como fuente de carbono es importante para establecer el hecho de que no existe un intercambio de genético en el sistema. A pesar de que se encuentra fuera de los alcances de este estudio, es necesario recomendar análisis más puntuales sobre este respecto. Establecer la estabilidad de la transformación de la cepa M113 y la incapacidad de transmitir sus habilidades a otras bacterias es importante en protocolos de liberación del microorganismo en los sistemas de tratamiento de aguas residuales.

Tabla 6. Detección de la cepa M113 y otros microorganismos capaces de crecer con LAS como única fuente de carbono (OM.), en diferentes puntos del sistema de dos etapas. Presente (+), ausente (-).

	RA	Recirculación	RM	Salida
M113	+	+	-	-
OM	-	-	-	-

CONCLUSIONES

In vitro cepa M113 de *Pseudomonas aeruginosa* fue capaz de degradar en condiciones óxicas un 81% de LAS, cuando éste se adicionó como única fuente de carbono; aunque usa preferencialmente a la glucosa como fuente de carbono. Mientras que, bajo condiciones anóxicas (donde se adicionaron 2.84 g NO₃⁻/g LAS, concentración suficiente para degradar el surfactante hasta CO₂) la cepa M113 eliminó un 80% del surfactante. Sin oxígeno molecular la velocidad específica de crecimiento fue superior con el surfactante (0.068 h⁻¹) que con la glucosa (0.059 h⁻¹); es decir, la bacteria presentó una mayor preferencia por el detergente bajo condiciones anóxicas. Ello demuestra que la cepa M113 posee el potencial para mineralizar el LAS de forma efectiva, cuando hay nitratos presentes en el medio.

En el cultivo anóxico (ensayos *in vitro*) se observó una pérdida de la biomasa, determinada por densidad óptica en el ensayo adicionado con el surfactante (método indirecto, ver Materiales y Métodos). Mediante el análisis microscópico no se apreció una lisis celular. Tampoco se detectó que hubiera una disminución en el tamaño celular promedio, comparado con el cultivo al que se le adicionó glucosa como fuente única de carbono. La subestimación de la concentración celular se le atribuyó, entonces, a la aglutinación de la biomasa celular promovida por la síntesis de un exopolímero, presumiblemente derivado de la degradación de la molécula del LAS. Este hecho es notable porque se ha propuesto que le proporciona a la bacteria una ventaja de adaptación, al conferirle la propiedad de adhesión a los lodos, que contribuye significativamente a su permanencia dentro del microecosistema de los lodos activados. Se cree necesario hacer un análisis de la composición del exopolímero sintetizado por la cepa M113, a fin de elucidar cuál es la probable vía de su síntesis y poder hacer conclusiones más robustas sobre su papel en el proceso.

Mediante el análisis de masas de los productos de la degradación del LAS por la cepa M113 bajo condiciones anóxicas (ensayos *in vitro*) se infirió que el primer ataque a la molécula da como resultado la escisión del grupo sulfonato, reacción que se da muy al principio del proceso de degradación del surfactante. Esto mismo sucede con el BAS como fuente de carbono (Campos-García *et al.*, 1999) Tras el primer ataque, se concluyó que la segunda reacción importante es la separación del LAS en dos productos: el 2,6,10-dodecatrienol y el ácido 1,2-bencendicarboxílico. Estas primeras reacciones de degradación de la molécula del LAS son las más difíciles de realizar por las bacterias. Una vez que se han llevado a cabo, un amplio grupo de microorganismos pueden intervenir en su mineralización mediante una amplia variedad de vías metabólicas (aerobias o anaerobias).

La bioaumentación de la cepa M113 dentro del reactor acidogénico fue exitosa, a pesar de no adicionar NO_3^- al medio de cultivo. La bacteria se estableció en los lodos del reactor acidogénico por un periodo que sobrepasó los 177 días, demostrando su estabilidad ecológica dentro del sistema. Los lodos acidogénicos, que albergaban a la cepa M113, eliminaron 198 mg/L de los 300 mg/L del LAS adicionado. La bacteria aceleró la remoción del LAS acumulado en los lodos, con lo que se recuperó la remoción de DQO en el reactor acidogénico previamente intoxicado con el surfactante. Sin embargo, la bacteria fue incapaz de colonizar el reactor metanogénico; y éste, al no poseer una microbiota que pudiera degradar la aún elevada concentración de LAS que recibía (alrededor de los 100 mg/L) lo acumuló en sus lodos (1.52 mg LAS/g SV), lo que afectó negativamente el desempeño del reactor metanogénico.

A diferencia de los ensayos *in vitro*, dentro del reactor acidogénico se adicionó únicamente 0.9 g NO_3^- /g LAS, para promover la degradación de la molécula. Con la adición de NO_3^- , el reactor acidogénico eliminó 225 mg/L de 300 mg/L de LAS. Sin embargo, la eliminación de la DQO por el sistema fue mala, ello se atribuyó a la acumulación del surfactante en los lodos de ambos reactores (alrededor de los 0.84 mg LAS/g SV), ya que a esa concentración el sistema se intoxicó y bajó su eficiencia de remoción de la DQO a valores alrededor del 50 %.

En los ensayos *in vitro* la bacteria degradó un 80% del surfactante adicionado (300 mg/L), pero en el reactor acidogénico sólo degradó el 73%; de tal forma, que la adición de concentraciones superiores a 0.9 g NO_3^- /g LAS ofrecen la posibilidad de alcanzar un mayor índice de degradación del surfactante.

La separación de la digestión anaerobia en dos etapas es un sistema potencialmente útil para el tratamiento de efluentes con elevadas concentraciones de surfactantes aniónicos (LAS). El reactor acidogénico, alojó a la cepa M113, y fue capaz de eliminar una gran parte del LAS adicionado, aunque el surfactante remanente se acumuló en los lodos de ambos reactores ocasionando la inhibición del sistema. En el futuro, se pueden explorar dos caminos para mejorar el funcionamiento del sistema, 1) disminuir la concentración de LAS ensayada a 200 mg/L, para determinar si es posible su remoción completa y evitar la acumulación del surfactante en los lodos y la consecuente inhibición del sistema; y 2) aumentar la concentración de NO_3^- adicionada para promover una mayor degradación del LAS.

ANEXOS

ANEXO I

QUÍMICA HOECHST DE MÉXICO S.A. DE C.V.

LABORATORIO INDUSTRIAL ACE

ESPECIFICACIONES

Producto: LAS – 45

Composición química: sal sódica de alquilbenceno lineal.

Análisis:	Especificaciones:
Aspecto	Pasta fluida color blanca
% ingrediente activo	45.0 ± 1.0
% P. E. E.	Máximo 1.2
% cloruro de sodio	Máximo 0.5
% sulfato de sodio	Máximo 1.1
pH (1.0 % M. A.)	9.0 ± 1.0
Hierro	Máximo 5 ppm
Color Klett (5.0 % M. A.)	Máximo 40
Densidad (g/L)	Aproximadamente 1.0
Peso molecular promedio	346.0 g

No contiene agentes de blanqueo.

No contiene agentes de conservación.

ANEXO II

Medio de RAAM (Shelton y Tiedje, 1984).

Cantidades de soluciones a adicionar para preparar un litro de medio de RAAM.

Sol. mineral 1.....	50 mL
Sol. mineral 2.....	50 mL
Sol. de vitaminas.....	1 mL
Sol. de oligoelementos.....	10 mL
Sol. FeSO ₄ •7H ₂ O (0.2%).....	1 mL
Sol. de NiCl ₂ (5 mg/L).....	10 mL

Para el medio anaerobio adicionar:

NaHCO ₃	1 g/L
--------------------------	-------

Solución mineral 1 (g/L).

K ₂ HPO ₄	6
---------------------------------------	---

Solución mineral 2 (g/L).

K ₂ HPO ₄	6
(NH ₄) ₂ SO ₄	6
NaCl.....	12
MgSO ₄ •7 H ₂ O.....	2.6
CaCl ₂ •2 H ₂ O.....	0.16

Solución de vitaminas (mg/L).

Biotina.....	2
Ácido fólico.....	2
Piridoxina-HCl.....	10
Tiamina-HCl.....	5
Riboflavina.....	5
Ácido nicotínico.....	5
Pantotenato de calcio.....	5
Vitamina B12.....	0.1
Ácido <i>p</i> -aminobenzoico.....	5
Ácido lipóico.....	5

Solución de oligoelementos.

Disolver 1.5 g de ácido nitrilotriacético con KOH hasta un pH de 6.5 después agregar los siguientes minerales (g/L):

MgSO ₄ •7 H ₂ O.....	3.0
MnSO ₄ •2 H ₂ O.....	0.5
NaCl.....	1.0
FeSO ₄ •7 H ₂ O.....	0.1
CoSO ₄	0.1
CaCl ₂	0.1
ZnSO ₄	0.1
CuSO ₄ •5 H ₂ O.....	0.01
AlK (SO ₄) ₂	0.01
H ₃ BO ₃	0.01
Na ₂ MoO ₄ •2 H ₂ O.....	0.01

Todas las soluciones se almacenan a 4° C.

ANEXO III

Information from Data File:

File : C:\HPCHEM\1\DATA\LAS.D
 Operator : Oscar
 Acquired : 30 Apr 97 4:46 pm using AcqMethod CURSO
 Sample Name:
 Misc Info :
 Vial Number: 1

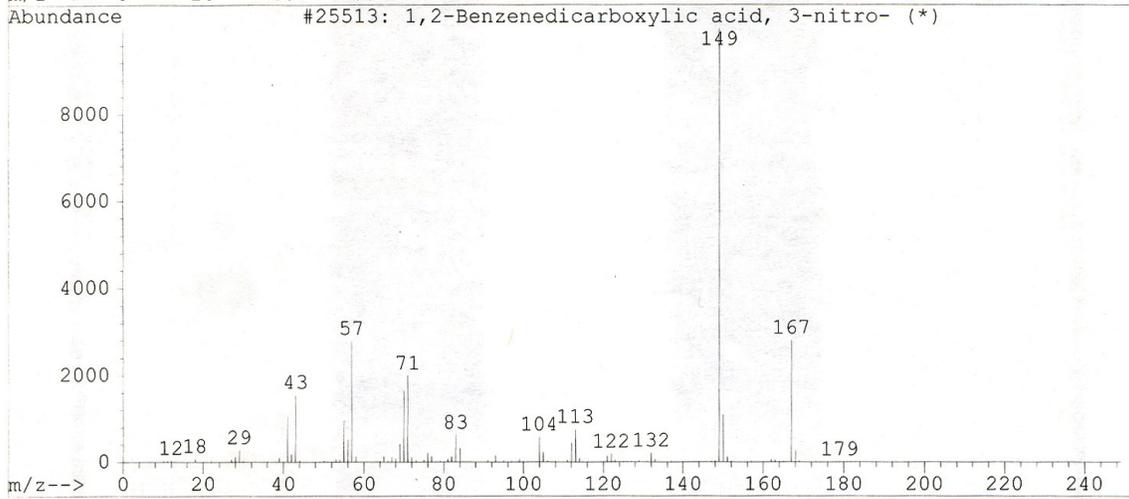
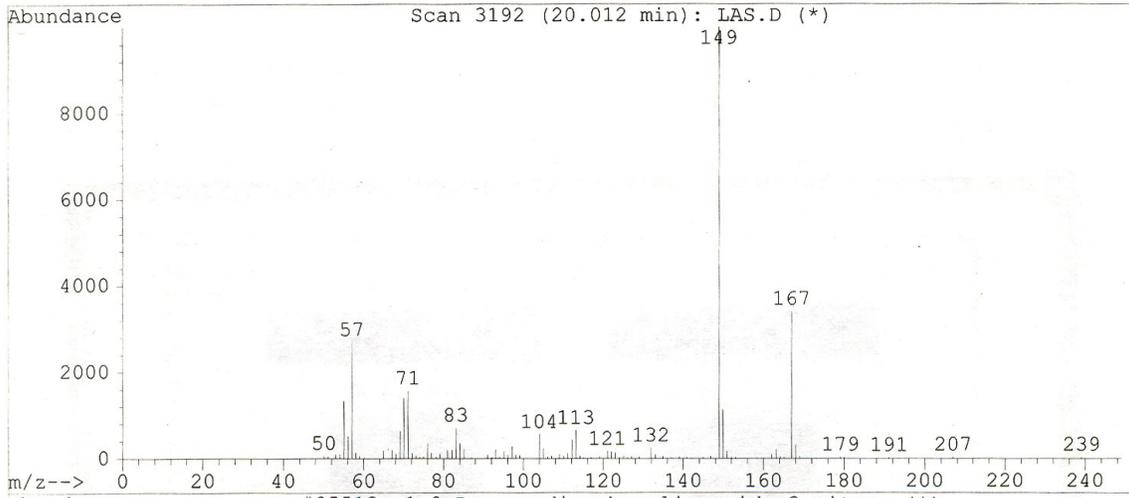
Search Libraries: C:\DATABASE\NBS75K.L Minimum Quality: 0

Unknown Spectrum: Apex
 Integration Params: AutoIntegrate

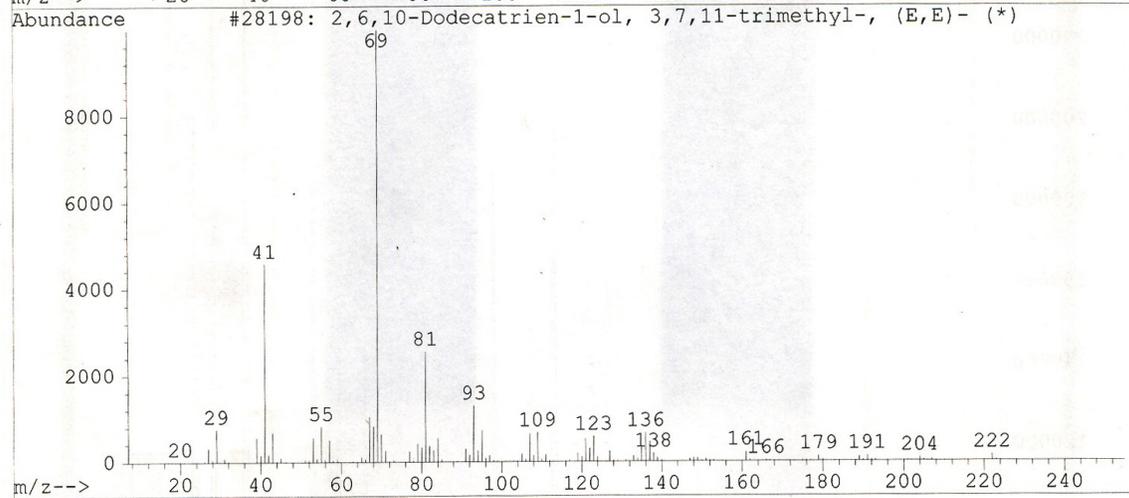
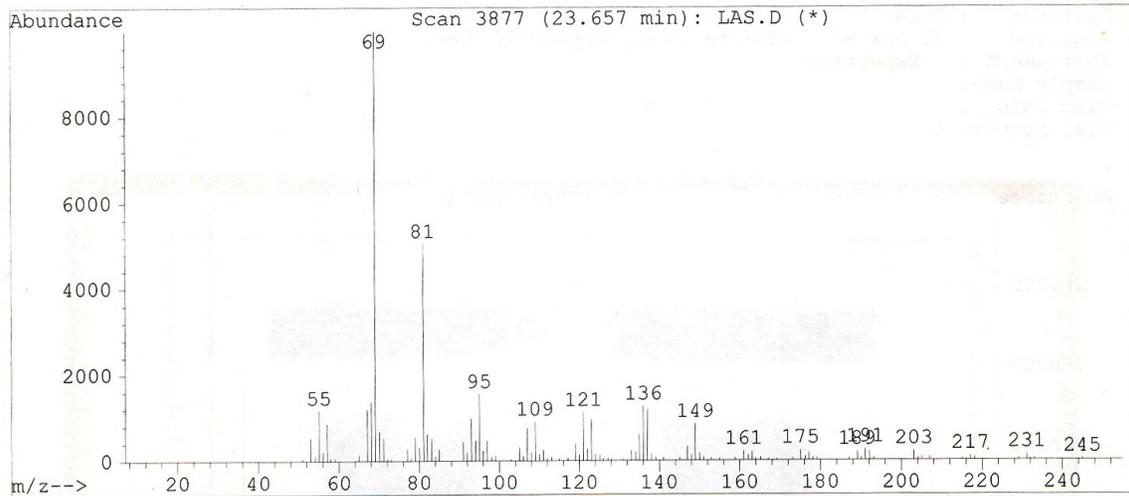
Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	13.32	4.02	C:\DATABASE\NBS75K.L Nonadecanoic acid, ethyl ester Pentadecanoic acid, ethyl ester Undecanoic acid, 2,6,10-trimethyl-	46382 37809 32389	018281-04-4 041114-00-5 001001-79-2	83 72 59
2	17.22	3.93	C:\DATABASE\NBS75K.L Ethanol, 2-(tetradecyloxy)- 17-Pentatriacontene Decanoic acid, silver(1+) salt	71663 58705 39258	002136-70-1 006971-40-0 013126-67-5	49 49 49
3	18.68	3.65	C:\DATABASE\NBS75K.L 1,2-Benzenedicarboxylic acid, 3-ni Phthalic acid, diisooctyl ester Benzothiazole, 2-methyl-	25513 53135 66648	000603-11-2 001330-91-2 000120-75-2	87 47 46
4	18.79	4.77	C:\DATABASE\NBS75K.L 1,2-Benzenedicarboxylic acid, 3-ni Phthalic acid, diisooctyl ester Bis(2-methoxyethyl) phthalate	25513 53135 39720	000603-11-2 001330-91-2 000117-82-8	91 49 47
5	19.62	1.80	C:\DATABASE\NBS75K.L 1,2-Benzenedicarboxylic acid, 3-ni 1,2-Benzenedicarboxylic acid, dicy Benzothiazole, 2-methyl-	25513 46907 66648	000603-11-2 000084-61-7 000120-75-2	74 53 49
6	20.03	11.13	C:\DATABASE\NBS75K.L 1,2-Benzenedicarboxylic acid, 3-ni 1,2-Benzenedicarboxylic acid, buty Phthalic acid, diisooctyl ester	25513 73481 53135	000603-11-2 000085-69-8 001330-91-2	91 59 58
7	20.18	3.70	C:\DATABASE\NBS75K.L 1,2-Benzenedicarboxylic acid, 3-ni 1,2-Benzenedicarboxylic acid, buty 1,2-Benzenedicarboxylic acid, buty	25513 73481 50567	000603-11-2 000085-69-8 000089-18-9	91 64 59
8	20.66	7.34	C:\DATABASE\NBS75K.L 1,2-Benzenedicarboxylic acid, 3-ni 1,2-Benzenedicarboxylic acid, buty 1,2-Benzenedicarboxylic acid, buty	25513 50567 73481	000603-11-2 000089-18-9 000085-69-8	91 59 59
9	21.73	2.12	C:\DATABASE\NBS75K.L 2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-tr 1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-tr 1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-tr	28198 28227 70620	000106-28-5 007212-44-4 007212-44-4	50 50 47
10	22.04	5.76	C:\DATABASE\NBS75K.L 3,7,11-Tridecatrien nitrile, 4,8,1 (E,E,E)-3,7,11,15-Tetramethylhexad 2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-tr	30165 38212 71838	006006-01-5 077898-97-6 004128-17-0	72 56 56

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
11	22.32	6.01	C:\DATABASE\NBS75K.L .Psi.,.psi.-Carotene, 7,7',8,8',11 3,7,11-Tridecatrienitrile, 4,8,1 1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-tr	74689 30165 28227	000502-62-5 006006-01-5 007212-44-4	78 72 56
12	22.59	6.97	C:\DATABASE\NBS75K.L .Psi.,.psi.-Carotene, 7,7',8,8',11 2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-tr 3,7,11-Tridecatrienitrile, 4,8,1	74689 28198 30165	000502-62-5 000106-28-5 006006-01-5	78 64 56
13	23.12	1.91	C:\DATABASE\NBS75K.L 9-Octadecenamide, (Z)- 9-Octadecenamide, (Z)- 3-Hexadecanol	39626 72284 71252	000301-02-0 000301-02-0 000593-03-3	58 50 43
14	23.30	12.03	C:\DATABASE\NBS75K.L .Psi.,.psi.-Carotene, 7,7',8,8',11 2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-tr 2,6,10-Dodecatrienoic acid, 3,7,11	74689 28198 33974	000502-62-5 000106-28-5 004176-79-8	72 72 59
15	23.38	1.87	C:\DATABASE\NBS75K.L .Psi.,.psi.-Carotene, 7,7',8,8',11 2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-tr 1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-tr	74689 70627 28227	000502-62-5 004602-84-0 007212-44-4	64 53 53
16	23.51	1.62	C:\DATABASE\NBS75K.L 2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-tr 2H-1-Benzopyran-2-one, 7-[(3,7-dim 5,9,13-Pentadecatrien-2-one, 6,10,	28198 42471 71796	000106-28-5 000495-02-3 001117-52-8	53 50 47
17	23.65	11.41	C:\DATABASE\NBS75K.L 5,9,13-Pentadecatrien-2-one, 6,10, 2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, 2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-tr	71796 69490 28198	001117-52-8 000105-87-3 000106-28-5	59 56 56
18	23.84	5.75	C:\DATABASE\NBS75K.L 2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-tr 2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-tr 2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-tr	28198 71837 71838	000106-28-5 004128-17-0 004128-17-0	64 56 56
19	29.21	4.20	C:\DATABASE\NBS75K.L 3-Hexadecene, (Z)- 1-Hexadecanol, 2-methyl- 17-Pentatriacontene	28772 35213 58705	034303-81-6 002490-48-4 006971-40-0	89 80 76

Library Searched : C:\DATABASE\NBS75K.L
Quality : 91
ID : 1,2-Benzenedicarboxylic acid, 3-nitro-



Library Searched : C:\DATABASE\NBS75K.L
Quality : 78
ID : 2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethyl-, (E,E)-



REFERENCIAS

- Akamatsu, Y. (1974). Osmotic stabilization of unsaturated fatty acid auxotrophs of *E. coli*. **J. Biochem.** 76: 553-561.
- Alexander, M. (1994). **Biodegradation and Bioremediation**. Academic Press. New York. pp. 302.
- Andreoni, V., Baggi, G., Colombo, M., Cavalca, L., Zangrossi, M. y Bernasconi, S. (1998). Degradation of 2,4,6-Tyrichlorophenol by a Specialized Organism and by Indigenous Soil Microflora: Bioaugmentation and Self-Remediability for Soil Restoration. **Lett. Appl. Microbiol.** 27: 86-92.
- Eaton, A. D., Clesceri, L. S. y Greenberg, A. E. (eds.) (1995). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 19va edición APHA, AWWA y WEF. USA. pp. 1220.
- Balch, W. E., Fox, G. E., Magrum, L. J., Woese, C. R. y Wolfe, R. S. (1979). Methanogens: Reevaluation of a Unique Biological Group. **Microbiol. Rev.** 43 (2): 260-296.
- Bartnik, F. G. (1992). Interaction of Anionic Surfactants with Proteins, Enzymes, and Membranes. En: Gloxhuber, C. y Künstler, K. (eds.) (1992). **Anionic Surfactants. Biochemistry, Toxicology and Dermatology**. 2da. Ed. Marcel Dekker Inc. New York. Vol. 43. pp 475.
- Bloem, J., Veninga, M. y Shepherd, J. (1995). Fully Automatic Determination of Soil Bacterium Numbers, Cell Volumes, and Frequencies of Dividing Cells by Confocal Laser Scanning Microscopy and Image Analysis. **Appl. Environ. Microbiol.** 61 (5): 926-936.
- Breure, A. M. (1995). Phase Separation in Anaerobic Digestion. En: **Curso-Taller Internacional sobre Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales**. Febrero-Marzo de 1995.

- Brock, T. D. y Madigan, M. T. (1993). **Microbiología**. 6ta. Edición. Prentice Hall. México. pp. 956.
- Buchanan, R. E. y Gibbons, N. E. (1984). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 8 Edición. Williams y Wilkins Company. Baltimore, U. S. A. p.p 1069.
- Cain, R. B. (1981). Microbial Degradation of Surfactants and Builder Components. En: Harrison, D. E. F., Higgings, I. J. y Watkinson, R (1981). **Hydrocarbons in Biotechnology**. John Wiley and Sons/Institute of Petroleum, London. pp. 198.
- Calamari, D. y Marchetti, R. (1973). The Toxicity of Mixtures of Metals and Surfactants to Rainbow Trout. (*Salmo gairdneri* Rich). **Wat. Res.** 7 (10): 1453-1464.
- Campos-García, J. Esteve, A., Vázquez-Duhalt, R., Ramos, J. L. y Soberón-Chávez, G. (1999). The Branched-Chain Dodecylbenzene Sulfonate Degradation Pathway of *Pseudomonas aeruginosa* W51D Involves a Novel Route for Degradation of the Surfactant Lateral Alkyl Chain. **Appl. Environ. Microbiol.** 65 (8): 3730-3734.
- Colbert S. F., Isakeit, T., Ferri, M., Weinhold, A. R., Hendson, M. y Shroth, M. N. (1993). Use of an Exotic Carbon Source to Selectively Increase Metabolic Activity and Growth of *Pseudomonas putida* in Soil. **Appl. Environ. Microbiol.** 59 (7): 2056-2063.
- Cresswell, D. G., Baldock, G. A., Chasseaud, L. F. y Hawkins, D. R. (1978). Toxicology Studies of Linear Alkylbenzene Sulphonate (LAS) in Rhesus Monkeys. II the Disposition of [¹⁴C]-LAS After Oral or Subcutaneous Administration. **Toxicology** 11: 5-17.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. y Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Anal. Chem.** 28 (3): 350-356.
- Eglund, P. G., Pelletier, D. A., Dispensa, M., Gibson, J. y Harwood, C. S. (1997). A cluster of bacterial genes for anaerobic benzene ring biodegradation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 94: 6484-6489.

- Evans, W. C. (1977). Biochemistry of the Bacterial Catabolism of Aromatic Compounds in Anaerobic Environments. **Nature**. 270: 17-22.
- Federle, T. W. y Schwab, B. S. (1992). Mineralization of Surfactants in Anaerobic Sediments of a Laundromat Wastewater Pond. **Wat. Res.** 26 (1): 123-127.
- Feigel, B. J., y Knackmuss, H. J. (1993). Syntrophic Interactions During Degradation of 4-aminobenzenesulfonic Acid by a Two Species Bacterial Culture. **Arch. Microbiol.** 159: 124-130.
- Flint, K. P. (1987). The Long-Term Survival of *Escherichia coli* in River Water. **J. Appl. Bacteriol.** 63: 261-270.
- Fujita, M., Ike, M. y Hashimoto, S. (1991). Feasibility of Wastewater Treatment Using Genetically Engineered Microorganisms. **Wat. Res.** 25 (8): 979-984.
- Fujita, M., Ike, M. y Uesugi, K. (1994). Operation Parameters Affecting the Survival of Genetically Engineered Microorganisms in Activated Sludge Processes. **Wat. Res.** 28 (7): 1667-1672.
- Garcia, J. L. (1990). Taxonomy and Ecology of Methanogens. **FEMS Microbiol. Rev.** 87: 297-308.
- García, J. L. (1991). Ecología de Inóculos Anaerobios Específicos en el Tratamiento de Aguas Residuales. **Memorias II Seminario Internacional sobre Biotecnología de la Agroindustria Cafetalera**. Manizales, Colombia.
- García, R. O., Terreros, J., Monroy, O. y Soberón, G. (1998). Bioaugmentación de lodos anaerobios para la degradación de surfactantes LAS. **1er. Simposio Latinoamericano de Tratamiento y Reuso del Agua y Residuos Industriales**. Tomo 1. Ciudad de México.
- Givskov, M., Eberi, L., Moller, S., Poulsen, L. K. y Molin, S. (1994). Response to Nutrient Starvation in *Pseudomonas putida* KT2442: Analysis of General Cross Protection, Cell Shape, and Macromolecular Content. **J. Bacteriol.** 176: 7-14.

- Gloxhuber, C. y Künstler, K. (1992). **Anionic Surfactants. Biochemistry, Toxicology and Dermatology.** 2da. Ed. Marcel Dekker Inc. New York. Vol. 43. pp 475.
- Goldstein, R. M., Mallory, L. M. y Alexander, M. (1995). Reasons for Possible Failure of Inoculation to Enhance Biodegradation. **Appl. Environ. Microbiol.** 50 (6): 977-983.
- Gómez, J., Mendez, R. y Lema, J. M. (1996). The Effect of Antibiotics on Nitrification Processes. **Appl. Biochem. Biotech.** 57/58: 869-876.
- Guiot, S. R., Pauss, A. y Costerton, J. W. (1992). A Structured Model of the Anaerobic Granule Consortium. **Wat. Sci. Tech.** 25 (7): 1-10.
- Guyot, J. P. (1990). Introducción a la Microbiología de los Digestores Anaerobios. **Memorias de Conferencias sobre Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales en América Latina.** Ciudad de México.
- Haack, S. K., Garchow, H., Klug, M. J. y Forney, L. J. (1995). Analysis of Factors Affecting the Accuracy, Reproducibility, and Interpretation of Microbial Community Carbon Source Utilization Patterns. **Appl. Environ. Microbiol.** 61 (6): 1458-1468.
- Hashimoto, S., Fujita, M. e Ike, M. (1987). Study on the Change of Bacterial Population in Activated Sludge Process Controlled by STR. **Proc. Environ. Sanit. Engng. Res.** 23: 251-260.
- Haug, W., Schmidt, A., Nortemann, B., Hempel, D. C., Stolz, A. y Knackmuss, H. J. (1991). Mineralization of the Sulfonated Azo Dye Mordant Yellow 3 by a 6-Aminonaphthalene-2-Sulfonate-Degrading Bacterial Consortium. **Appl. Environ. Microbiol.** 57 (11): 3144-3149.
- Heijnen, C. E., van Elsas, D. J., Kuikman, P. J. y van Veen, J. A. (1988). Dynamics of *Rhizobium leguminosarum* Biovar *trifolli* Introduced in Soil: the Effect of Bentonite Clay on Predation by Protozoa. **Soil. Biol. Biochem.** 20: 483-488.
- Holmquist, L. y Kjelleberg, S. (1993). Changes in Viability, Respiratory Activity and Morphology of the Marine *Vibrio spp.* Strain S14 During Starvation of

- Individual Nutrients and Subsequent Recovery. **FEMS Microbiol. Ecol.** 12: 215-224.
- Hons, G. (1996). Alkylarylsulfonates: History, Manufacture, Analysis, and Environmental Properties. En: Schink, M. J. y Fowkes, F. M. (1996). **Anionic Surfactants. Organic Chemistry.** Marcel Dekker Inc. New York. Vol. 56. pp 469.
 - Hršak, D. (1996). Co-metabolic Transformation of Linear Alkylbenzenesulphonates by Methanotrophs. **Wat. Res.** 30 (12): 3092-3098.
 - Iannotti, E. L., Fischer, J. R. y Sievers, D. M. (1982). Characterization of Bacteria from a Swine Manure Digester. **Appl. Environ. Microbiol.** 43 (1): 136-143.
 - Jain, R. K., Sayler, G. S., Wilson, J. T., Houston, L. y Paca, D. (1987). Maintenance and Stability of Introduced Genotypes in Groundwater Aquifer Material. **Appl. Environ. Microbiol.** 53 (4): 996-1002.
 - Jiménez, L., Breen, A., Thomas, N., Federle, T. W. y Sayler, G. S. (1991). Mineralization of Linear Alkylbenzene Sulfonate by a Four-Member Aerobic Bacterial Consortium. **Appl. Environ. Microbiol.** 57 (5): 1566-1569.
 - Jobson, A., McLaughlin, M., Cook, F. D. y Westlake, D. W. S. (1974). Effect of Amendments on the Microbial Utilization of Oil Applied to Soil. **Appl. Microbiol.** 27: 166-171.
 - Jones, R. A., Broder, M. W. y Stotzky, G. (1991). Effects of Genetically Engineered Microorganisms on Nitrogen Transformations and Nitrogen-Transforming Microbial Populations in Soil. **Appl. Environ. Microbiol.** 57 (9): 2641-2647.
 - Kandel, A. O., Nybroe, O. y Rasmussen, O. F. (1992). Survival of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Degrading *Alcaligenes eutrophus* AEO106 (pR101) in Lake Water Microcosms. **Microbiol. Ecol.** 24: 291-303.
 - Kertesz, M. A., Kölbener, P., Stockinger, H., Beil, S. y Cook, A. M. (1994). Desulfonation of Linear Alkylbenzenesulfonate Surfactants and Related Compounds by Bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 60 (7): 2296-2303.

- Kimerle, R. A. y Swisher, R. D. (1977). Reduction of Aquatic Toxicity of Linear Alquilbenzene Sulfonate (LAS) by Biodegradation. **Wat. Res.** 11 (1): 31-37.
- Kjelleberg, S., Humphrey, B. A. y Marshall, K. C. (1983). Initial Phases of Starvation and Activity of Bacteria at Surfaces. **Appl. Environ. Microbiol.** 46 (6): 978-984.
- Knowles, R. (1982). Denitrification. **Microbiol. Rev.** 46: 43-70.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L. y Cox, M. M. (1993). **Principles of Biochemistry.** Worth Publishers. pp 1013.
- Lettinga, G. y Hulshoff-Pol, L. W. (1995). Wastewater Treatment and Resource Recovery System, the Place of Anaerobic Treatment and Digestion Processes. **Curso-Taller Internacional sobre Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales.** Febrero – Marzo. Ciudad de México.
- Lettinga, G., de Zeeuw, W., Hulshoff-Pol, L. W., Wiegant, W. y Rinzema, A. (1985). Anaerobic Wastewater Treatment Based on Biomass Retention with Emphasis on the UASB-Process. **Anaerobic Digestion, 5th International Symposium.** China. State Biogas Association. pp. 279-301.
- Lewis, M. A. (1991). Chronic and Sublethal Toxicities of Surfactants to Aquatic Animals: a Review and Risk Assessment. **Wat. Res.** 25 (1): 101-113.
- Locher, H. H., Leisinger, T. y Cook, A. M. (1991). 4-Sulfobenzoato 3,4-Dioxygenase Purification and Properties of a Desulphonative 2-Component Enzyme System from *Comamonas testosteroni* T-2. **Biochem. J.** 274: 883-842.
- Lucassen-Reynders, E. H. (1985). **Anionic Surfactants. Physical Chemistry of Surfactant Action.** Marcel Dekker Inc. New York. Vol. 11. pp 455.
- Macarie, H. (1996). La Digestión Anaerobia, una Tecnología Adecuada para el Tratamiento de las Aguas Residuales de Algunas Industrias Químicas y Petroquímicas. **IV Seminario-Taller Latinoamericano Tratamiento de Aguas Residuales.** Bucaramanga, Colombia.
- Mah, R. A., Ward, D. M., Baresi, M. y Glass, T. L. (1977). Biogenesis of Methane. **Ann. Rev. Microbiol.** 31: 309-341.

- Marchesi, J. R., Owen, S. A., White, G. F., House, W. A. y Russell, N. J. (1994). SDS-Degrading Bacteria Attach to Riverine Sediment in Response to the Surfactant or its Primary Biodegradation Product Dodecan-1-ol. **Microbiology** 140: 2999-3006.
- McLeod, F. A., Guiot, S. R. y Costerton, J. W. (1990). Layered Structure of Bacterial Aggregates Produced in an Upflow Anaerobic Sludge Bed and Filter Reactor. **Appl. Environ. Microbiol.** 56 (5): 1598-1607.
- McClure, N. C., Weghtman, A. J. y Fry, J. C. (1989). Survival of *Pseudomonas putida* UWC1 Containing Cloned Catabolic Genes in a Model Activated-Sludge Unit. **Appl. Environ. Microbiol.** 55 (10): 2627-2634.
- Moller, J., Gaam, H., Steckel, T., Wedebye, E. B. y Westermann, P. (1995). Inhibitory Effects on Degradation of Diesel Oil in Soil-Microcosms by a Commercial Bioaugmentation Product. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 54: 913-918.
- Monroy, H. O. (1998). **Modelamiento y Control de un Sistema de Digestión Anaerobia en dos Etapas.** Tesis de Doctorado en Biotecnología. UNAM Fac. de Química. pp. 159.
- Monroy, O., Meraz, M., Montoya, L., Fama, G. y Macarie, H. (1997). Anaerobic Digestion in Mexico -State of the Technology, Limitations and Potential for its Development. **Proceedings of the 8th International Conference Anaerobic Digestion.** Sendai Japan, May 25-29. Vol. 2: 272-284.
- Mountfort, D. O., Brulla, W. J., Krumholz, L. R. y Bryant, M. P. (1984). *Syntrophus buswelli* gen. nov. sp. nov. a Benzoate Catabolizer from Methanogenic Ecosystems. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 34: 216 - 217.
- Muxí, L. (1994). Aspectos Microbiológicos de los Procesos de Nitrificación-Desnitrificación. En: **Memorias del III Taller y Seminario Latinoamericano de "Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales.** Montevideo Uruguay.
- National Research Council (1993). **In Situ Bioremediation: When Does it Work?** National Academy Press, Washington, D.C. pp. 224.

- Okpokwasili, G. C. y Olisa, A. O. (1991). River-water Biodegradation of Surfactants in Liquid Detergents and Shampoos. **Wat. Res.** 25 (11): 1425-1429.
- Olguín-Lora, P. y Monroy-Hermosillo, O. (1996). Modelling a Two-Stage Anaerobic Digestion Process. En: Moo-Young, M., Anderson, W. A. y Chakrabarty, A. M. (eds.). (1996). **Environmental Biotechnology Principles and Applications**. Kluwer Academic Publisher. Boston. pp. 412.
- Patoczka, J. y Pulliam, G. W. (1990). Biodegradation and secondary effluent toxicity of ethoxylated surfactants. **Wat. Res.** 24 (8): 965-972.
- Pérez, A. B. (1994). **Degradación Anaerobia de Surfactantes**. Tesis de Maestría en Biotecnología. UAM-Iztapalapa. pp 86.
- Sámano, C. y Noyola, A. (1996). Análisis del Costo de Inversión y Operación de Sistemas de Tratamiento de Aguas Residuales Municipales para Pequeñas Poblaciones. **Federalismo y Desarrollo**. 54: 49-54.
- Schink, B. (1988). Principles and Limits of Anaerobic Degradation: Environmental and Technological Aspects. En: Zehnder, J. B. (ed.) (1988). **Biology of Anaerobic Microorganisms**. Ed. J. Wiley and Sons. New York. pp 872.
- Schick, M. J. y Fowkes, F. M. (1996). **Anionic Surfactants. Organic Chemistry**. Marcel Dekker Inc. New York. Vol. 56. pp 469.
- Shelton, D. R. y Tiedje, J. M. (1984). General Method for Determining Anaerobic Degradation Potential. **Appl. Environ. Microbiol.** 47 (4): 850-857.
- Shlomi, E. R., Lankhorts, A. y Prins, R. A. (1978). Methanogenic Fermentation of Benzoate in an Enrichment Culture. **Microbiol. Ecol.** 4: 249-261.
- Sigoillot, J. C. y Nguyen, M. H. (1992) Complete Oxidation of Linear Alkylbenzene Sulfonate by Bacterial Communities Selected from Coastal Seawater. **Appl. Environ. Microbiol.** 58 (4): 1308-1312.
- Soberón-Chávez, G., Campos, J., Haïdour, A., Ramos, J. L. y Ortigoza, J. (1996). Selection and Preliminary Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* Strain Mineralizing Some Isomers in a Branched-Chain

- Dodecylbenzenesulphonate Mixture. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 12: 367-372.
- Stouthamer, A. H. (1988). Dissimilatory Reduction of Oxidized Nitrogen Compounds. En: Zehnder, J. B. (ed.) (1988). **Biology of Anaerobic Microorganisms**. Ed. J. Wiley and Sons. New York. pp 872.
 - Swisher, R. D. (1987). **Surfactant Biodegradation**. Second edition. Marcel Dekker Inc. New York. pp. 1085.
 - Tabor, C. F. y Barber, L. B. (1996). Fate of Linear Alkylbenzene Sulfonate in the Mississippi River. **Environ. Sci. Technol.** 30 (1): 161-171.
 - Takada, H., Mutoh, K., Tomita, N., Miyadzu, T. y Ogura, N. (1994). Rapid Removal of Linear Alkylbenzenesulfonates (LAS) by Attached Biofilm in an Urban Shallow Stream. **Wat. Res.** 28 (9): 1953-1960.
 - Terzić, S., Hršak, D. y Ahel, M. (1992). Primary Biodegradation Kinetics of Linear Alkylbenzene Sulphonates in Estuarine Waters. **Wat. Res.** 26 (5): 585-591.
 - Therien, N., La Calve, P. y Jones, P. (1984). A Respirometric Study of the Influence of Aliphatic Alcohols on Activated Sludge. **Wat. Res.** 18 (7): 905-910.
 - UM-BBD (2000). **Base de datos de biocatálisis y biodegradación de la Universidad de Minnesota**. En: <http://umbbd.ahc.umn.edu/index.html>.
 - Unden, G., Becker, S., Bongaerts, J., Schirawski, J. y Six, S. (1994). Oxygen Regulated Expression in Facultative Anaerobic Bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**. 66: 3-23.
 - van der Meer, R. J., de Vos, W. M., Harayama, S. y Zehnder A. J. B. (1992). Molecular Mechanisms of Genetic Adaptation to Xenobiotic Compounds. **Microbiol. Rev.** 56: 677-694.
 - van der Meer, R. J., Roelofsen, W., Scbraa, G. y Zehnder, J. B. (1987). Degradation of Low Concentrations of Dichlorobenzenes and 1,2,4-Trichlorobenzene by *Pseudomonas* sp. Strain P51 in Non-Sterile Soil Columns. **FEMS Microbiol.** 48: 333-341.

- van Veen, J. A., van Overbeek, L. S. y van Elsas, J. D. (1997). Fate and Activity of Microorganisms Introduced into Soil. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 61 (2): 1221-135.
- Viñas, M., Martínez, J., Baselli, B. y Galain, C. (1990). Separación de Etapas Acidogénica y Metanogénica: Un Ejemplo con Agua Residual de Fabricación de Pulpa Termomecánica. **Memorias de Conferencias sobre Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales en América Latina.** Ciudad de México.
- Vodyanov, I. (1997). Joint EC-US Workshop on Environmental Biotechnology (1996). **Biophy. Newsletter.** 27: 1-8.
- Wagener, S. y Schink, B. (1987). Anaerobic Degradation of Nonionic and Anionic Surfactants in Enrichment Cultures and Fixed-Bed Reactors. **Wat. Res.** 21 (5): 615-622.
- Yoshimura, K. (1984). Adsorption and Biodegradation of LAS by Microorganisms. **XV Jornadas Españolas sobre Detergentes.**
- Yoshinari, T. (1980). N₂O Reduction by *Vibrio succinogenes*. **Appl. Environ. Microbiol.** 39 (1): 81-84.
- Zehnder, A. J. B., Huser, B. A., Brock, T. D. y Wuhrman, K. (1980). Characterization of an Acetate-Decarboxylating, Non-Hydrogen Oxidizing Methane Bacterium. **Arch. Microbiol.** 124: 1-11.
- Zehnder, J. B. y Stumm, W. (1988). Geochemistry and Biogeochemistry of Anaerobic Habitats. En: Zehnder, J. B. (ed.) (1988). **Biology of Anaerobic Microorganisms.** Ed. J. Wiley and Sons. New York. pp 872.
- Zhao, H., Yang, D., Woese, C. R. y Bryant, M. P. (1990). Assignment of *Clostridium bryantii* to *Syntrophospora bryantii* ge. nov., comb. nov. on the Basis of a 16s rRNA Sequence Analysis of its Crotonate-Grow Pure Culture. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 40: 40-44.