

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**



**Casa abierta al tiempo**

**Degradación del alquilbencen sulfonato lineal (LAS)  
en un reactor acidogénico bioaumentado con una cepa  
de *Pseudomonas aeruginosa* M113.**

**Comité tutorial:**

Director: Dr. Óscar Monroy Hermosillo

Asesor: Dra. Mónica Meraz Rodríguez

Asesor: Dra. Gloria Soberón Chávez

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

**FRANCISCO JAVIER ALMENDARIZ TAPIA**

México,D.F.

Noviembre del 2001

El Posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana esta incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo consejo, con el convenio **471-0/Maestría en Biotecnología**.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la  
Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación de resultados que presentó:

Francisco Javier Almendariz Tapia

El día \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 2001.

## **H. Jurado:**

Director: Dr. Óscar Monroy Hermosillo\_\_\_\_\_.

Asesor: Dra. Mónica Meraz Rodríguez\_\_\_\_\_.

Asesor: Dra. Gloria Soberón Chávez\_\_\_\_\_.

Sinodal: M. en C. Gloria Moreno Rodríguez\_\_\_\_\_.

Sinodal: Dra. Florina Ramírez Vives\_\_\_\_\_.

Sinodal: M. en B. Flor de Maria Cuervo López\_\_\_\_\_.

# AGRADECIMIENTOS

A mis hermanos Luis, Gloria, Ana, Martín, Alberto, Pedro, Adriana y Silvia, por creer en mí y por tantas experiencias compartidas a lo largo de toda una vida.

A mis tíos Roberto y Antonio, por su apoyo incondicional y por su amistad.

Al H. Jurado que revisó pacientemente esta tesis y evaluó la defensa de mi trabajo.

A mis supervisores, Dr. Óscar Monroy Hermosillo, Dra. Mónica Meráz Rodríguez y Dra. Gloria Soberón Chávez, por su entero apoyo y dedicación, mismos que hicieron posible la realización de esta tesis. Gracias también por sus consejos y principalmente su amistad.

A la Comunidad Económica Europea, por el financiamiento otorgado durante el desarrollo de esta tesis, a través del Proyecto “Desarrollo de estrategias de control por digestión anaerobia de efluentes que contienen sustancias recalcitrantes (C. E. 2115-30574)”.

A la M. en B. Carmen Fajardo, Dra. Florina Ramírez, Dr. Hervé Macarie y Dra. Margarita Salazar, por el tiempo que pacientemente dedicaron para esclarecer algunas de mis dudas.

A mis compañeros del laboratorio de tratamiento de aguas residuales, Angélica, Lourdes, Zenia, Ignacio, Salomón, Sergio, Antonieta, Acela, Paty, Maricela y Julieta, por su grata compañía durante las jornadas de trabajo.

Porque las amistades nacen y crecen al alimentarse de experiencias. Gracias a Maribel, Julio López, Ignacio, Angélica, Luis Cira, Keiko Shirai, Yoyi, Maricela, Alejandro Medina, Alejandro Olmos y Zenia, por brindarme su entera amistad.

A la Sra. Ivonne Novoa, por hacerme sentir el calor de un hogar. Gracias por todas sus atenciones, sus consejos, sus buenos deseos y por la confianza que ha depositado en mí.

# DEDICATORIAS

A mi madre, Socorro Tapia, por la fuerza y la entereza que me has inculcado para no sucumbir ante la adversidad.

Madre, sé que deseabas con toda tu alma verme convertir en un hombre de bien, siempre bajo tu atenta mirada. También sé que sufrías al imaginarte el día en que me fuera de tu lado y aún así me diste tu apoyo, aprendiendo a sobrellevar mis ausencias. Madre, ahora me enorgullece decirte que soy lo que soy gracias a ti y este momento te lo dedico con todo mi cariño.

A mi padre, José Almedariz. Por la paciencia con la que me inculcaste el amor a Dios. Por enseñarme a ver que el obstáculo más grande a vencer es uno mismo.

Padre, tus ideas, tus buenos valores, tus sabios consejos y tu ejemplo permanecen latentes en mí aunque tu ya no estás aquí. Porque Dios no pudo haberme dado mejor regalo que tu compañía y el privilegio de haber sido y ser tu hijo. Bendito seas en dónde quiera que estés.

A Maribel, mi complemento. Por haber llegado a mi vida, tomar mi mano y caminar a mi lado... por permanecer junto a mí. Por inyectarme tus ganas de vivir, tu fortaleza. Por compartir mis alegrías e ilusiones. Por ser parte de mi esencia.

Por tu paciencia, tu apoyo y tu comprensión.

Por lo que fuiste, por lo que eres y por lo que serás.

Por lo que fuimos, por lo que somos y por lo que seremos.

Por haberte encontrado y porque te amo por sobre todas las cosas.

# CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE TABLAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
RESUMEN.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Surfactantes.....	1
1.1.1 Características generales.....	1
1.1.2 Alquilbencen sulfonato de sodio (LAS).....	3
1.1.3 Propiedades generales de los alquilbencen sulfonato.....	4
1.1.4 Alquilbencen sulfonato en el ambiente.....	5
1.1.5 Toxicidad de los surfactantes.....	7
1.1.6 Biodegradabilidad de LAS.....	8
1.2 Digestión anaerobia.....	13
1.2.1 Primera etapa: hidrólisis y fermentación.....	14
1.2.2 Segunda etapa: acetogénesis.....	16
1.2.3 Tercera etapa: metanogénesis.....	16
1.2.4 Digestión anaerobia en dos etapas.....	18
1.3 Reactor anaerobio de lecho de lodo con flujo ascendente (UASB).....	20
1.3.1 Gránulos anaerobios.....	22
1.3.2 Distribución microbiana en los gránulos.....	23
1.4 <i>Pseudomonas</i> .....	24
1.4.1 Sustrato de las <i>Pseudomonas</i> .....	25
1.4.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa M113.....	26
2. JUSTIFICACIÓN.....	27
3. OBJETIVOS.....	30
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
4.1 Material.....	31
4.1.1 Medios de cultivo .....	31
4.1.2 Reactivos.....	31

4.1.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa M113.....	31
4.1.4 Reactores .....	32
4.2 Métodos analíticos.....	32
4.2.1 Biomasa.....	32
4.2.2 Unidades formadoras de colonias (UFC).....	33
4.2.3 Demanda química de oxígeno.....	33
4.2.4 Determinación del alquilbencen sulfonato de sodio (LAS).....	34
4.2.5 Determinación de ácidos grasos volátiles (AGV).....	36
4.2.6 Determinación de metano y bióxido de carbono.....	38
4.2.7 Cuantificación de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> y NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .....	39
4.2.8 Sólidos .....	39
4.2.9 Análisis de microscopía electrónica de barrido.....	40
4.3 Propagación de la bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> M113.....	41
4.4 Pruebas de crecimiento a diferentes concentraciones de LAS:NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .....	42
4.4.1 Condiciones de desnitrificación.....	42
4.4.2 Condiciones aerobias.....	43
4.4.3 Longitud de la bacteria M113.....	43
4.5 Coeficiente específico de crecimiento ( $\mu$ ).....	44
4.6 Estudios de biodegradación en continuo.....	44
4.6.1 Condiciones de operación de los reactores.....	45
4.6.2 Cálculos para reactores continuos.....	45
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
5.1 Efecto del surfactante LAS en el crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa M113.....	48
5.2 Efecto de LAS en la morfología de <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> cepa M113.....	53
5.3 Medio específico para la cepa M113.....	55
5.4 Estudios de degradación en continuo.....	55
5.4.1 Inoculación del reactor con <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> cepa M113.....	55
5.4.2 Degradación del alquilbencen sulfonato de sodio y de lactosa.....	56
6. CONCLUSIONES.....	70
7. BIBLIOGRAFÍA.....	72
8. ANEXOS.....	78
8.1 Medios de cultivo.....	78
8.1.1 Medio mineral RAAM.....	78

8.1.2 Medio Luria (LB).....	79
8.1.3 Medio para determinar unidades formadoras de colonias (UFC).....	79
8.2 Curvas estándar.....	80
8.2.1 Curva estándar de LAS.....	80
8.2.2 Curva estándar de nitrato.....	81
8.2.3 Curva estándar de biomasa.....	82
8.2.4 Curva estándar de DQO.....	83
8.2.5 Curva estándar de metano.....	84
8.2.6 Curva estándar de LAS.....	86
 PUBLICACIÓN RELACIONADA CON ESTA TESIS.....	 87

# LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1.1 Géneros de bacterias involucradas en la digestión anaerobia.....	18
Tabla 1.2 Velocidades de crecimiento de bacterias acidogénicas y metanogénicas.....	19
Tabla 5.1 Longitudes de la células de <i>P. aeruginosa</i> M113.....	54
Tabla 5.2 Efectividad del medio selectivo para <i>P. aeruginosa</i> M113.....	55
Tabla 5.3 Composición de los lodos acidogénicos y metanogénicos .....	59
Tabla 5.4 Microbiología de un reactor acidogénico.....	67
Tabla 5.5 Comparación entre reactores acidogénicos bioaumentado con <i>P. aeruginosa</i> cepa M113 y no bioaumentado.....	69
Tabla 8.1 Composición del medio mineral RAAM.....	78
Tabla 8.2 Composición del medio Luria.....	79
Tabla 8.3 Composición del medio para determinar unidades formadoras de colonias en lodos del reactor acidogénico.....	80
Tabla 8.4 Curva estándar de LAS.....	80
Tabla 8.5 Curva estándar de nitrato.....	81
Tabla 8.6 Curva estándar de biomasa.....	82
Tabla 8.7 Curva estándar de la demanda química de oxígeno.....	83
Tabla 8.8 Curva estándar de metano.....	85
Tabla 8.9 Curva estándar de LAS.....	86

# LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1 Efecto de la concentración de surfactantes en la adsorción a superficies sólidas.....	2
Figura 1.2 Alquilbencen sulfonato de sodio LAS.....	3
Figura 1.3 Destino del alquilbencen sulfonato en el ambiente.....	6
Figura 1.4 Eliminación de LAS y DQO en la digestión anaerobia en dos etapas (Terreros, 1999).....	11
Figura 1.5 Proceso general de la descomposición anaerobia de la materia orgánica.....	15
Figura 1.6 Esquema típico de un reactor UASB.....	21
Figura 1.7 Población microbiana en el gránulo metanogénico.....	23
Figura 1.8 Población microbiana en el gránulo acidogénico.....	24
Figura 4.1 Sistema de reactores en dos etapas.....	32
Figura 4.2 Medidor de biogás.....	39
Figura 5.1 Cinética de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa M113 bajo condiciones anóxicas.....	48
Figura 5.2 Consumo de nitrato por la cepa M113.....	49
Figura 5.3 Cinética de crecimiento de la cepa M113 bajo condiciones aerobias.....	50
Figura 5.4 Determinación del coeficiente específico de crecimiento de la cepa M113.....	51

Figura 5.5	Velocidades específicas de crecimiento, consumo de LAS y consumo de nitrato por la cepa M113 bajo condiciones anóxicas.....	52
Figura 5.6	Constante de inhibición de la cepa M113 en condiciones anóxicas.....	52
Figura 5.7	Observación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa M113 bajo el microscopio óptico.....	54
Figura 5.8	Remoción de la materia orgánica en continuo.....	56
Figura 5.9	Remoción de LAS en continuo.....	57
Figura 5.10	LAS adsorbido en los lodos acidogénicos y metanogénicos.....	58
Figura 5.11	Micrografías de barrido del lodo acidogénico.....	60
Figura 5.12	Velocidad específica de consumo de LAS en continuo.....	62
Figura 5.13	Desorción y consumo de LAS en el reactor acidogénico durante la etapa de lavado.....	63
Figura 5.14	AGV en el efluente del reactor acidogénico.....	64
Figura 5.15	AGV en el efluente del reactor metanogénico.....	64
Figura 5.16	Evolución del valor de pH en el sistema de dos etapas.....	65
Figura 5.17	Producción de metano en el reactor metanogénico.....	66
Figura 5.18	Permanencia de la cepa M113 en el lodo acidogénico.....	67
Figura 5.19	Consumo de nitrato en el reactor acidogénico y metanogénico.....	68
Figura 8.1	Curva estándar de sustancias activas al azul de metileno (SAAM).....	81
Figura 8.2	Curva estándar de nitrato.....	82

*Lista de figuras*

---

Figura 8.3	Curva estándar de biomasa.....	83
Figura 8.4	Curva estándar de la demanda química de oxígeno (DQO).....	84
Figura 8.5	Curva estándar de metano.....	84
Figura 8.6	Curva estándar de LAS por HPLC.....	86

# RESUMEN

Se estudió la degradación del alquilbencen sulfonato lineal (LAS) por digestión anaerobia en dos etapas, en donde la etapa acidogénica se bioaumentó con la cepa *Pseudomonas aeruginosa* M113 para mejorar la degradación de LAS en condiciones anaerobias.

Se realizaron pruebas de biodegradación del surfactante en lote y utilizando la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* M113, observando que la máxima degradación fue de un 35% y que la bacteria dejó de asimilar el surfactante al sufrir cambios en su morfología. El coeficiente específico de crecimiento disminuyó al aumentar la concentración del surfactante.

Los experimentos realizados en continuo mostraron que la degradación de LAS sólo se llevó a cabo en la etapa acidogénica, no habiendo contribución de la etapa metanogénica. La metanogénesis acetoclástica se inhibió por una acumulación del surfactante en los lodos, concluyendo que las bacterias acidogénicas resistieron la presencia del surfactante debido a que no se observó una inhibición en esta etapa. Al comparar al sistema bioaumentado contra el no bioaumentado, empleado por Terreros (1999), se observó que no existe una mejora en el proceso.

Durante el experimento de 265 días, la cepa M113 permaneció en el conglomerado acidogénico con una cuenta de alrededor de  $10^4$  unidades formadoras de colonia·mL<sup>-1</sup> y experimentos en lote demuestran que el surfactante puede ser degradado por la cepa pura hasta en un 35%.

La tesis esta dividida en 8 capítulos. En el capítulo 1 se presenta una revisión bibliográfica en donde se mencionan los antecedentes, los surfactantes y sus características generales, el alquilbencen sulfonato de sodio LAS con su respectiva definición, características, destino en el ambiente, toxicidad y biodegradación. Se describe el proceso de la digestión anaerobia, el reactor UASB junto con las características de los gránulos y se documentan las generalidades de las *Pseudomonas aeruginosa* en donde se menciona la cepa M113. En este capítulo se concluye que es necesario estudiar más a fondo la digestión anaerobia de los surfactantes para lograr la completa degradación de LAS.

En el capítulo 2 se encuentra la justificación del trabajo en donde se menciona la necesidad de separar la digestión anaerobia en dos etapas así como la bioaumentación de la etapa acidogénica para mejorar la degradación del LAS. El objetivo de este trabajo se encuentra en el capítulo 3 y fue el de estudiar la degradación del surfactante alquilbencen sulfonato de sodio (LAS) y carbohidratos por digestión anaerobia en dos etapas, aumentando la fase acidogénica con una cepa mutada de *Pseudomonas aeruginosa*.

El capítulo 4 contiene los materiales y métodos en donde se describe el sistema de reactores utilizados en la digestión anaerobia de dos etapas, así como el medio de alimentación, la cepa *Pseudomonas aeruginosa* M113 y las técnicas analíticas empleadas. En el capítulo 5 se presentan los resultados y discusión de: a) La propagación de la cepa M113 y las pruebas de degradación y toxicidad en altas concentraciones del surfactante. b) Experimentos de la degradación de LAS en reactores anaerobios continuos en dos etapas, en donde la etapa acidogénica se bioaumentó con la cepa M113.

El capítulo 6 contiene las conclusiones generales en donde la principal conclusión es que no existe una mejora del proceso al bioaumentarlo con la cepa M113.

La bibliografía usada para el desarrollo de la presente tesis y los anexos de la misma se localizan en los capítulos 7 y 8, respectivamente. El capítulo de anexos incluye la publicación del trabajo en la revista *water science and biotechnology* así como la metodología para la preparación de los medios de cultivo utilizados, las curvas estándares de calibración de las técnicas analíticas.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Surfactantes.

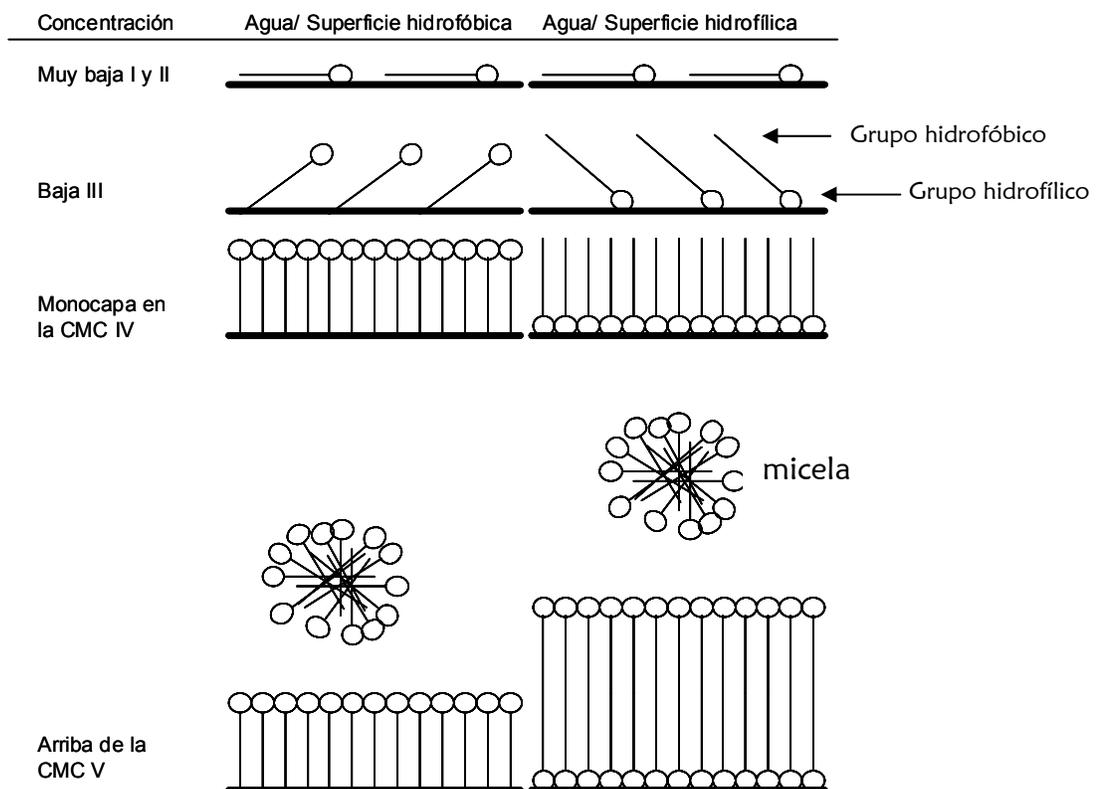
**1.1.1 Características generales.** Los surfactantes están entre los productos más versátiles de la industria química, ya que aparecen en diversos productos tales como aceites de motor, productos farmacéuticos, detergentes, pozos petroleros, etc.

En una molécula sencilla, un surfactante combina un grupo fuertemente hidrofóbico con un grupo fuertemente hidrofílico. El grupo hidrofóbico es usualmente un hidrocarburo de cadena larga, con menos frecuencia un hidrocarburo halogenado u oxigenado y el grupo hidrofílico es un grupo iónico o altamente polar. De acuerdo a Rosen (1978), dependiendo de la naturaleza del grupo hidrofílico, los surfactantes se clasifican como:

1. Aniónicos. La porción activa de la molécula es de carga negativa, por ejemplo,  $\text{RCOO}^-\text{Na}^+$  (jabón),  $\text{RC}_6\text{H}_4\text{SO}_3^-\text{Na}^+$  (alquilbencen sulfonato).
2. Catiónicos. La porción activa de la molécula es de carga positiva, por ejemplo,  $\text{RNH}_3^+\text{Cl}^-$  (sal amina de cadena larga),  $\text{RN}(\text{CH}_3)_3^+\text{Cl}^-$  (cloruro de amonio cuaternario).
3. Zwitteriónicos. Tanto cargas positivas como negativas están presentes en la porción activa, por ejemplo,  $\text{RN}^+\text{H}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$  (aminoácido de cadena larga),  $\text{RN}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$  (sulfobetaina).

4. No iónicos. La porción activa aparentemente no tiene cargas iónicas, por ejemplo,  $\text{RCOOCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$  (monoglicerido de ácido graso de cadena larga),  $\text{RC}_6\text{H}_4(\text{OC}_2\text{H}_4)_x\text{OH}$  (alquilfenol de polioxietilenoato).

Un agente activo de superficie (surfactante) es una sustancia que cuando está presente a muy bajas concentraciones en un sistema agua-sólido tiende a adsorberse en las superficies (figura 1.1, I y II). Al aumentar la concentración del surfactante (figura 1.1, III) las moléculas empiezan a orientarse con respecto a la superficie, grupo hidrofílico con superficie hidrofóbica y grupo hidrofóbico con superficie hidrofílica.

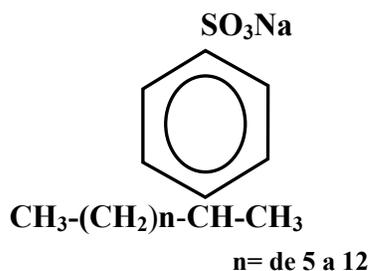


**Figura 1.1** Efecto de la concentración en la adsorción de surfactantes

Cuando la concentración de las moléculas es suficiente para formar una monocapa (figura 1.1, IV) se alcanza lo que se conoce como concentración micelar crítica (CMC). Y al momento de que la concentración del surfactante excede la CMC, en las superficies hidrofóbicas no suceden cambios aparentes, pero en las hidrofílicas se pueden formar estructuras de doble capa. Las moléculas en solución forman estructuras conocidas como micelas. (figura 1.1, V) (Porter, 1994).

**1.1.2 Alquilbencen sulfonato de sodio lineal, LAS.** Se encuentra entre las sales sulfónicas ácidas de los surfactantes aniónicos. La distribución del anillo benceno es aleatoria a lo largo de la cadena alquilo. La fórmula empírica de un sulfonato puede expresarse como  $RC_6H_4SO_3^-M^+$ , donde R es el grupo alquilo de  $C_{10}$ - $C_{14}$  y M es un ión metálico alcalino o una amina derivativa (Rosen, 1978; Porter, 1994).

La longitud de la cadena es en la mayoría de los casos alrededor de 12 carbonos. Es relativamente barato, pero para una producción en gran escala, requiere equipo resistente a ácido y sofisticado equipo de sulfonación. Una producción en pequeña escala puede ser hecha con ácido sulfúrico deshidratado ( $H_2SO_4 + SO_3$ ). Grandes cantidades son vendidas libres de ácido sulfónico el cual se neutraliza con aminas.



**Figura 1.2** Alquilbencen sulfonato de sodio LAS

Los surfactantes en forma de sales de sodio son los más empleados en el ámbito industrial y en detergentes caseros. El surfactante en forma de sal de trietanolamina es usado en detergentes líquidos y cosméticos, en forma de sal de isopropilamina se utiliza para lavado en seco y en forma de sal de dimetilamina se utiliza en emulsiones agrícolas y como solventes de colorantes. Los alquilbencen sulfonatos de alto peso molecular son preparados con cadenas largas de oleofinas ( $C_{13}$ - $C_{15}$ ), son mas solubles en aceite, y son empleados como lubricantes y aditivos de aceites (Rosen 1978).

### 1.1.3 Propiedades generales de los alquilbencen sulfonato.

1. Las propiedades físicas y las propiedades de superficie son influenciadas principalmente por el variado peso molecular y el número de carbonos en la cadena alquila. También los isómeros pueden influir en estas propiedades. La variación de la cadena de alquil causa que cada isómero tenga diferentes características de degradación y absorción (Tabor y Baber 1996).
2. Solubilidad. Debido a la variabilidad en su estructura, la solubilidad de los LAS está en el intervalo de 0.2 a 160 mg·L<sup>-1</sup>. Los surfactantes ácidos son solubles en agua y solubles o dispersables en solventes orgánicos. Sin embargo, en diluciones con agua el surfactante puede formar líquidos altamente viscosos o un gel entre 30-80% de surfactante en agua. Para surfactantes en forma de sales de sodio no son solubles en solventes orgánicos, excepto en alcoholes.
3. Estabilidad química. Son resistentes a la hidrólisis en ácidos o álcalis calientes.
4. Compatibilidad a ionizarse en soluciones acuosas. Completamente ionizados, y los surfactantes ácidos libres de ácido sulfúrico son solubles en agua de modo que la solubilidad no se afecta a pH bajos.
5. Propiedades de superficie. La concentración micelar critica (CMC) del dodecilbencen sulfonato de sodio (P.M. 348.4) es aproximadamente 500 mg·L<sup>-1</sup>. El coeficiente de adsorción de LAS (K) en sedimentos varía desde 22 hasta 105 mg<sub>LAS</sub>/mg<sub>sedimento</sub> (González-Mazo *et al.*, 1998; Fytianos *et al.*, 1998).

6. Propiedades funcionales. Humectante:  $C_{11}$ - $C_{13}$  es óptimo. Espumante: en mezclas con surfactantes de éter sulfatos se genera una buena estabilidad espumante. Detergencia:  $C_{13}$ - $C_{14}$  son óptimos.
7. Desventajas de LAS. Los LAS usados en nuestro cuidado personal causan problemas de irritación en la piel, para reducir estos problemas se le adicionan sulfosuccinatos, sarcosinatos o anfótericos.

### 1.1.4 Alquilbencen sulfonato en el ambiente.

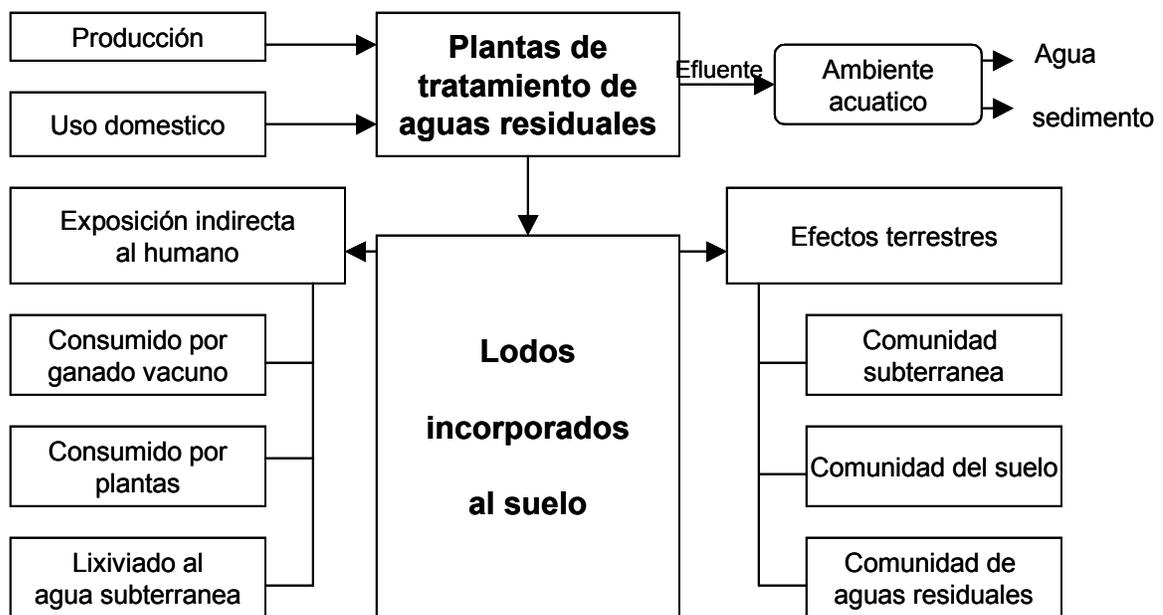
*Recalcitrancia.* Un compuesto puede definirse como recalcitrante en un ambiente particular si mantiene su identidad en dicho ambiente por más de un periodo arbitrario de tiempo. En sistemas con tiempos de residencia menos definidos tales como sedimentos de ríos, lagos y océanos un compuesto es recalcitrante si por años es resistente a la biodegradación. La recalcitrancia de una molécula puede deberse a a) Su resistencia inherente a la degradación por virtud a su estructura química, por ejemplo algunos plásticos o b) Factores ambientales que previenen su acumulación.

Los factores ambientales involucran condiciones físicas (temperatura, potencial de agua, accesibilidad de un componente, etc.), condiciones químicas (pH, potencial Redox, concentración del compuesto, substratos adicionales, efectos sinérgicos o antagónicos de otras moléculas, etc.) y condiciones biológicas (por ejemplo presencia de un organismo ó combinación de organismos, información genética, tiempo suficiente para la adaptación, etc.) (Hollinger *et al.*, 1988).

*Destino del alquilbencen sulfonato de sodio (LAS).* Los detergentes son producidos en grandes cantidades los cuales son usados por mucha gente y después de su uso son depositados en el ambiente. Un detergente común usado en el agua, deja niveles de surfactante en el rango de 1 a 20 mg·L<sup>-1</sup>. Las aguas de desperdicio domésticas están

disueltas en equilibrio con una cantidad proporcional absorbida a partículas (APHA, 1989).

Los surfactantes son altamente adsorbidos y se asocian tanto a sedimentos en ambientes acuáticos como a lodos, en sistemas de plantas de tratamiento. Los lodos pasan después por una digestión anaerobia y son depositados en los suelos en donde hay una exposición indirecta al humano y daños al ambiente terrestre (figura 1.3). En otras circunstancias, los productos de desecho son descargados directamente sin tratamiento; un ejemplo de tales prácticas ocurren en las comunidades rurales en donde las aguas negras son usadas para la agricultura sin diluir, o liberadas a los embalses o infiltradas sin un tratamiento previo (Wolf de y Feijtel, 1998).



**Figura 1.3** Destino del alquilbencen sulfonato en el ambiente ( Wolf de y Feijtel 1998).

Barber *et al.*, (1995) monitorearon el destino de los LAS en un ambiente anaerobio natural, encontrando que no existe degradación y sí una separación de homólogos debido a la adsorción de LAS de cadenas mas grandes. Por otro lado, Krueger *et al.* (1998) corroboraron estos datos encontrando también una separación de homólogos de cadenas largas durante el transporte en zonas naturales.

La adsorción de LAS en algunos ambientes puede representar hasta el 60% de la cantidad total (González-Mazo *et al.*, 1998). El efecto ambiental y el destino de los LAS se debe a fenómenos de adsorción en los sedimentos y materia particulada (Fytianos *et al.*, 1998). Así mismo, la acumulación de LAS en los sedimentos se ajusta a la isoterma de Freundlich (González-Mazo *et al.*, 1998; Fytianos *et al.*, 1998),

$$C_s = K(C_w)^{1/n}$$

en dónde  $C_s$  es la concentración de LAS en el sedimento y  $C_w$  la concentración de LAS en el agua, K puede ser definida como un coeficiente de adsorción o de distribución y representa la cantidad de LAS adsorbido en  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (sedimento).  $1/n$  es igual a la medida para la intensidad de adsorción. Para  $n=1$  la partición entre las dos fases es independiente de la concentración.

**1.1.5 Toxicidad de los surfactantes.** Las propiedades de superficie de los surfactantes, en algunos casos causan una influencia negativa en la viabilidad de los microorganismos y en el crecimiento de las plantas. En el agua causan un efecto negativo en la supervivencia de los peces (Fytianos *et al.*, 1998).

Los efectos de los surfactantes en las células son muy complejos. Incluyen penetración de membrana implicando una solubilización parcial de sus componentes estructurales (Wagener y Shink, 1987), rompen la membrana plasmática por interacción con los

lípidos de la membrana. Tienden a reducir la tensión superficial y por tanto la miscibilidad de las moléculas intra y extracelulares, provocando reacciones indeseables.

Los surfactantes catiónicos reaccionan con los grupos fosfatos, cargados negativamente, de los fosfolípidos de la membrana para así romper la membrana plasmática. Los surfactantes aniónicos afectan la porción lipoproteica de la membrana plasmática, son menos tóxicos que los agentes catiónicos (son repelidos por la carga neta negativa de la superficie bacteriana) y por esto son usados en jabones y detergentes (Lim, 1998).

En la digestión anaerobia las bacterias que más se ven afectadas son las metanogénicas acetoclásticas afectando la producción de metano, asociándose con una acumulación elevada de acetato (Wagener y Schink, 1987).

**1.1.6 Biodegradabilidad de LAS.** Se ha observado que LAS persiste en ambientes anaerobios como sedimentos acuáticos y lodos de digestores (Wolf de y Feijtel, 1998), además de que no se degrada en condiciones anaerobias (Maurer, 1965; Wagener y Schink, 1987; Federle y Schwab, 1992), aunque también se ha observado que en ambientes aerobios existe una degradación casi total (Jiménez *et al.*, 1991; Sigoilloit y Nouyen, 1992; Moreno *et al.*, 1998). Swisher (1981) tomó en cuenta las siguientes consideraciones para lograr la degradación de LAS en un sistema biológico:

- a) Utilizar un inóculo de diferentes especies bacterianas para que sus funciones bioquímicas se suplementen entre sí.
- b) Proveer un acceso, ya sea controlando o no, la entrada continua de bacterias provenientes del medio ambiente exterior, con el fin de mantener o incrementar la diversidad en el sistema.
- c) Permitir una amplia oportunidad para desarrollar y mantener la aclimatación de las bacterias al medio y probar el compuesto antes y después de la inoculación.

- d) Incluir en el medio una amplia gama de factores de crecimiento bacteriano y nutrientes para conocer sus variados requerimientos.
- e) Limitar a un nivel apropiado la concentración de compuestos bacteriostáticos o bacteriotóxicos (por ejemplo de LAS) en el medio.

*Condiciones anaerobias.* Maurer (1965) estudió el efecto (en lote) de un alquilbencen sulfonato lineal comercial y uno preparado en su laboratorio, demostrando que no existe degradación y sí una inhibición de la metanogénesis a partir de 214 ppm. Hršak (1996), mostró la importancia de las interacciones entre los metanotróficos involucrando enzimas metano monooxigenasas para iniciar la transformación cometabólica, y los heterotróficos en la transformación del C<sub>9</sub>-, C<sub>10</sub>-LAS y el LAS comercial.

Wagener y Schink (1987), investigaron la degradación anaeróbica de tres surfactantes aniónicos (C12 alquilbencen sulfonato lineal (LAS), dodecil sulfonato de sodio (AS) y dodecil sulfato de sodio (SDS) en experimentos de incubación y en escala de laboratorio en un reactor de lecho fijo. Estos surfactantes mostraron un efecto inhibitorio en la metanogénesis a concentraciones superiores a los 100 mg·L<sup>-1</sup> en un lodo de un reactor anóxico y también mostraron inhibición a concentraciones superiores de 50 mg·L<sup>-1</sup> en un lodo anóxico lagunar. En bajas concentraciones no hubo inhibición pero la metanogénesis no se vio aumentada, permaneciendo constante. La degradación de estos surfactantes bajo condiciones anaeróbicas fue significativamente baja.

Federle y Schwab (1992) confirmaron estos resultados, comparando la mineralización de LAS radiomarcado en sedimentos anaerobios de una laguna que recibe aguas residuales de lavanderías y sedimentos de lagunas no contaminadas como control. El LAS no se mineralizó en los sedimentos anaerobios a pesar de que los microorganismos habían estado expuestos al surfactante por mas de 25 años. La aclimatación no induce

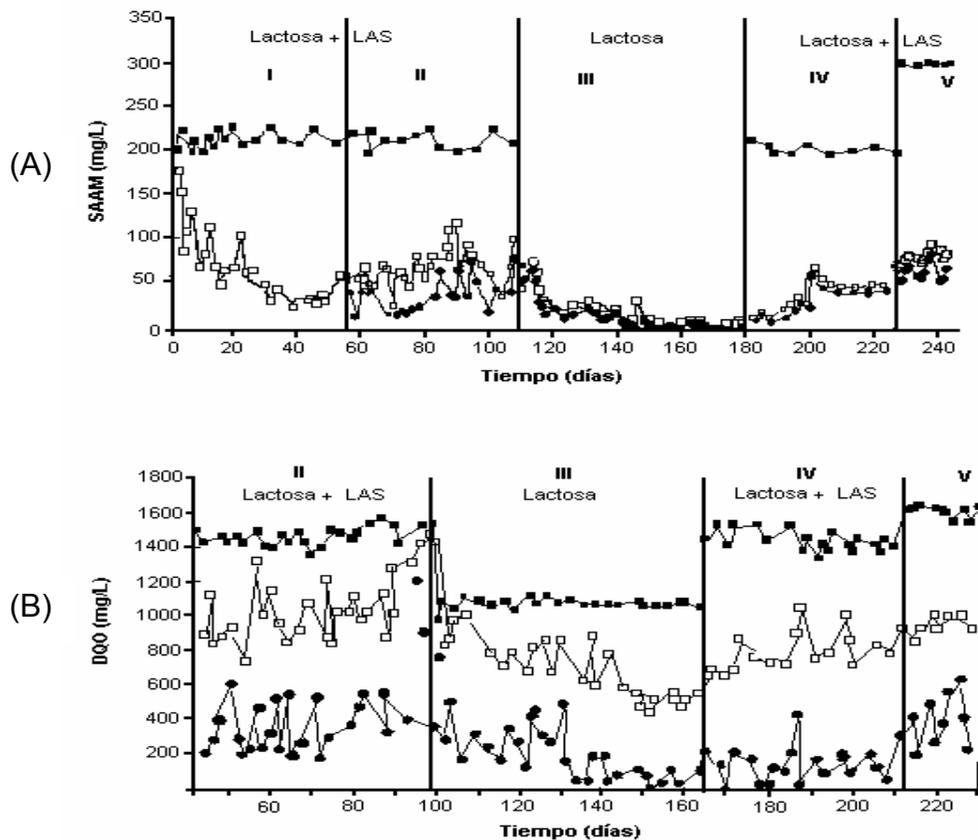
un mecanismo degradativo para LAS, ellos sugieren la necesidad de oxígeno molecular para la degradación inicial.

Trabajos realizados por Pérez (1994), demostraron que el dodecibencen sulfonato de sodio ejerce sobre los lodos una inhibición de la metanogénesis en una concentración de 500 mg·L<sup>-1</sup> con una disminución de la actividad metanogénica bacteriana en un 50% (LD<sub>50</sub>) en 250 mg·L<sup>-1</sup>, en esta concentración la degradación encontrada fue de un 36%.

Terreros (1999), trabajó con un sistema de digestión anaerobia separada en dos etapas, acidogénica y metanogénica, para la degradación del alquilbencen sulfonato de sodio (LAS). En la figura 1.4 (A y B) se muestra la eliminación de LAS como sustancias activas al azul de metileno (SAAM) y de la materia orgánica como demanda química de oxígeno (DQO) respectivamente, durante un periodo de 210 días, separados en 5 etapas. En la etapa I y II el sistema se alimentó con 1 g·L<sup>-1</sup> de lactosa y 200 mg·L<sup>-1</sup> de LAS, se observa la capacidad de este sistema para la remoción del LAS. El reactor acidogénico es capaz de retener hasta un 75% de LAS como sustancias activas al azul de metileno (SAAM), pero a partir del día 50 el LAS se acumuló en los lodos causando una disminución de la eficiencia de remoción de la materia orgánica (DQO) (B). Como se puede apreciar (A) el LAS solo se mineraliza en el reactor acidogénico sin la participación del segundo reactor.

Cuando se suspendió el LAS (etapa III) de la alimentación adicionando solo 1 g·L<sup>-1</sup> de lactosa, se registró una salida constante del surfactante en los efluentes de ambos reactores lo cual indica que el LAS acumulado es desorbido de los lodos. El sistema tardó 70 días en recuperar la actividad de eliminación de la DQO durante los cuales se eliminaron alrededor de 1650 mg de SAAM lo que indica las grandes cantidades de surfactante adherido a los lodos. Al alimentar de nuevo con 200 mg·L<sup>-1</sup> (etapa IV) de LAS y 1 g·L<sup>-1</sup> de lactosa se observa que existe una mejora en la eliminación de la materia

orgánica pero al aumentar a  $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de LAS mas  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de lactosa (etapa V) ocurre una acumulación del surfactante y el sistema pierde su eficiencia.



**Figura 1.4** Eliminación de LAS como sustancias activas al azul del metileno (A) y eliminación de la materia orgánica como demanda química de oxígeno (DQO) (B) en los reactores acidogénico y metanogénico. -■- Alimentación; -□- Efluente del reactor acidogénico y -●- efluente del reactor metanogénico (Terreros, 1999).

*Condiciones aerobias.* Swisher (1981) estudió la degradación de  $C_{12}$ LAS y de tres LAS comerciales, en un reactor de flujo continuo con un tiempo de residencia hidráulica de

6 horas durante 15 meses, encontrando que los cuatro tipos de LAS se degradan de un 80 a un 90%

Jiménez *et al.* (1991), demostraron que la degradación de LAS se lleva a cabo por consorcios bacterianos y que una sola cepa es incapaz de biodegradar al surfactante. Sigoillot y Nguyen (1992), confirmaron estos resultados y sugirieron que el paso clave en la mineralización del LAS está en el rompimiento del anillo bencénico y que la completa mineralización se lleva a cabo por asociación entre bacterias de sedimentos anaerobios y aerobias estrictas.

Prats *et al.* (1997), estudiaron la degradación de LAS en una planta de tratamiento de aguas residuales, observando que existe una degradación superior al 90% y que la mayor degradación ocurre en el tanque de aireación.

Krueger *et al.* (1998), estudiaron la degradación de LAS a varios rangos de oxígeno encontrando que existe una mineralización parcial de LAS en concentraciones de oxígeno  $<1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Al aumentar la concentración de oxígeno a  $8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  observaron una degradación mayor del surfactante, quedando solamente homólogos de cadena corta.

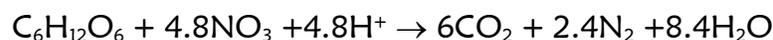
Moreno *et al.* (1998) estudiaron la degradación de LAS a concentraciones de 2 a  $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , encontrando que los tiempos de vida media fueron de 8 a 18 horas para las concentraciones bajas y de 0.49 a 1.46 horas para las concentraciones altas. Mostraron que la longitud de la cadena influye en la velocidad de degradación encontrando que cadenas más largas tienen velocidades de degradación más rápidas que las cadenas más cortas.

## 1.2 Digestión anaerobia.

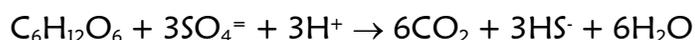
La digestión anaerobia es un proceso complejo constituido por un conjunto de reacciones consecutivas y paralelas, biocatalizadas por diferentes especies de microorganismos (Viñas, 1994).

Los procesos anaerobios ocurren en ausencia de oxígeno. En este caso otros compuestos oxidados como nitratos, sulfatos o  $\text{CO}_2$ , actúan como aceptores finales de electrones, de esta forma se tienen tres vías de degradación, que se representan como las siguientes reacciones globales:

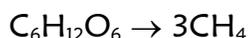
Desnitrificación (medio anóxico):



Sulfatorreducción:



Metanogénesis:



En los procesos anaerobios el 90% de la energía contenida en la materia orgánica (medida como demanda química de oxígeno, DQO), es convertida en biogás y el 10% restante es asimilado por las células. Desde el punto de vista bioquímico, la baja producción celular haría al proceso anaerobio poco eficiente; sin embargo, en la práctica esta característica es una gran ventaja dado que se evita la necesidad de tratar importantes volúmenes de la biomasa generada antes de su disposición final.

En ausencia de oxígeno disuelto, la presencia de nitratos o sulfatos en el agua residual a tratar y las condiciones de operación de los biorreactores son los principales factores

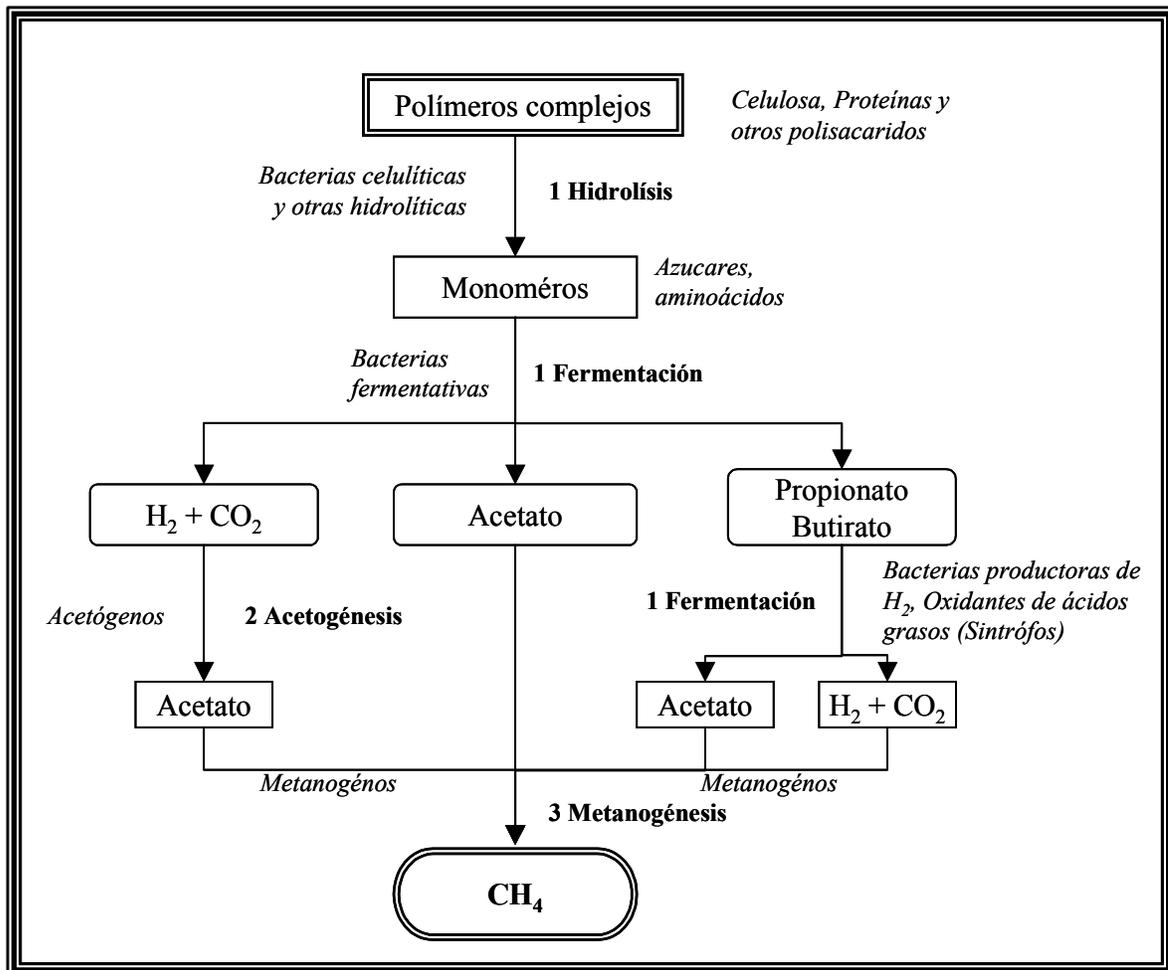
que determinan la ruta a seguir durante la degradación de la materia orgánica. No obstante, la vía más interesante es la metanogénesis, ya que se obtiene metano como subproducto el cual puede ser utilizado como energético (Saval y Noyola, 1992).

La degradación anaerobia metanogénica de la materia orgánica se desarrolla en tres etapas y ocurre secuencialmente con la participación de 5 principales grupos bacterianos. Las etapas son las siguientes: 1) Hidrólisis y fermentación, 2) Acetogénesis y 3) Metanogénesis (Figura 1.5).

**1.2.1 Primera etapa: hidrólisis y fermentación.** En esta primera etapa se inicia el fenómeno de digestión anaeróbica. Las bacterias responsables de esta etapa pertenecen a diferentes grupos y pueden ser anaerobias facultativas o estrictas (Guyot, 1990).

*Bacterias hidrolíticas y fermentadoras.* Las bacterias hidrolíticas producen las enzimas que se encargan de degradar los polímeros presentes en el agua residual (carbohidratos, proteínas y lípidos) convirtiéndolos a compuestos de bajo peso molecular como azúcares, aminoácidos, alcoholes, ácidos carboxílicos y compuestos aromáticos. Entre las actividades enzimáticas comúnmente encontradas están celulasas, hemicelulasas, xilanasas, pectinasas, amilasas, proteasas, lípasas y fosfolípasas.

Por su parte, las bacterias fermentadoras transforman los azúcares y aminoácidos en ácidos grasos volátiles (acetato, propionato, butirato, valerato), CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> y células, mientras que los lípidos y los ácidos grasos de cadena larga son convertidos en ácidos grasos volátiles, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> a través de un mecanismo de  $\beta$ -oxidación (Saval y Noyola, 1992).



**Figura 1.5** Proceso general de la descomposición anaeróbica mostrando como varios grupos de anaerobios de fermentación actúan juntos en la conversión de materiales orgánicos complejos finalmente en metano y CO<sub>2</sub>. La digestión anaerobia involucra tres etapas: 1. Hidrólisis y fermentación, 2. Acetogénesis y 3. Metanogénesis (Brock y Madigan, 1991).

En esta etapa, si no se controla bien el reactor puede ocurrir una desestabilización del proceso entero, dado que en caso de una sobrecarga la hidrólisis de la materia orgánica provoca una sobreproducción de ácidos que va a acidificar exageradamente el medio y bajar el pH hasta niveles inhibitorios (Guyot, 1990).

**1.2.2 Segunda etapa: acetogénesis.** Durante la acetogénesis, los productos de la fermentación son convertidos en acetato, hidrógeno y bióxido de carbono (Guyot, 1990).

*Bacterias acetógenas.* Las bacterias acetógenas productoras obligadas de hidrógeno, OHPA (obligate hydrogen producing acetogen) transforman los ácidos grasos de cadena corta en acetato, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>, pero se ven inhibidas por el H<sub>2</sub> que ellas mismas producen. Su característica distintiva es que mantienen estrecha relación con las bacterias metanógenas hidrogenófilas las cuales remueven el H<sub>2</sub> producido, de tal forma que su actividad no se ve inhibida. Esta relación sintrófica recibe el nombre de transferencia interespecie de hidrógeno. Entre las bacterias más estudiadas están *Syntrophomonas wolfei* que oxida ácidos grasos saturados de C<sub>4</sub> a C<sub>8</sub> por mecanismos de β-oxidación *Syntrophobacter wolinii* que actúa sobre propionato, *Clostridium bryantii* que oxida ácidos grasos de C<sub>4</sub> a C<sub>11</sub> y *Syntrophomonas sapovorans* que oxida ácidos grasos de C<sub>4</sub> a C<sub>18</sub> y algunos insaturados (Saval y Noyola 1992).

**1.2.3 Tercera etapa: Metanogénesis.** Esta etapa, es la última en el proceso de la degradación anaerobia de la materia orgánica, y es llevado a cabo por el grupo de las bacterias metanogénicas. Estas bacterias son anaeróbicas estrictas y es necesario tener potenciales de oxidorreducción inferiores a -330mV para que pueda iniciarse la metanogénesis, estas dos características hace que estas bacterias deben ser manipuladas en condiciones de anaerobiosis perfectas (Guyot, 1990).

*Bacterias metanógenas acetoclásticas.* La función de este grupo bacteriano es convertir el ácido acético en un biogás que está compuesto por metano en mayor proporción y CO<sub>2</sub>. Existen dos géneros fundamentalmente, *Methanosarcina* que tiene una baja afinidad por el acetato (K<sub>s</sub> = 250 mg·L<sup>-1</sup>), su velocidad específica de crecimiento (μ) aumenta conforme se incrementa la concentración de acetato alcanzando valores de

0.3 d<sup>-1</sup>, puede ser inhibida por H<sub>2</sub> y formiato. *Methanotrix* tiene mayor afinidad por acetato (K<sub>s</sub> = 30 mg·L<sup>-1</sup>), su velocidad específica de crecimiento se ha reportado en el orden de 0.1 d<sup>-1</sup>, no utiliza H<sub>2</sub> ni formiato como sustratos.

*Bacterias metanógenas hidrogenófilas.* Como se mencionó anteriormente, estas bacterias co-existen con las bacterias acetógenas, catalizan la reacción entre el H<sub>2</sub> producido por estas últimas y el CO<sub>2</sub> para dar metano. Estas bacterias controlan el potencial de óxido reducción (POR) permitiendo a las bacterias acetógenas recuperar el NAD<sup>+</sup> necesario para la generación de acetato.

*Bacterias sulfatorreductoras.* La importancia de este grupo depende de la presencia de sulfatos en el agua residual a tratar. Este grupo se caracteriza esencialmente por su capacidad para reducir los sulfatos a sulfuro de hidrógeno. Existen dos grupos de bacterias sulfatorreductoras:

Grupo I: crecen en presencia de lactato y sulfato pero no pueden utilizar acetato, propionato o butirato como único donador de electrones y fuente de carbono, en este grupo resaltan los géneros *Desulfomonas* y *Desulfovibrio*.

Grupo II: pueden utilizar alguno de los ácidos grasos volátiles, benzoato o aun crecer quimioautotróficamente con H<sub>2</sub> o formiato como donadores de electrones y CO<sub>2</sub> como única fuente de carbono. Los géneros representativos de este grupo son *Desulfobacter*, *Desulfococcus* y *Desulfosarcina*.

La existencia de co-cultivos es la principal razón que dificulta el aislamiento de las bacterias involucradas en la digestión anaerobia, además de los largos tiempos de duplicación y los requerimientos de estricta anaerobiosis. En la tabla 1.1 se enlistan algunos géneros de bacterias que han sido aislados de ambientes metanógenos (Saval y Noyola, 1992).

Por otro lado, cabe señalar que también se han desarrollado técnicas para caracterizar la biomasa con el fin de conocer los grupos de microorganismos presentes en un lodo anaerobio, sin embargo todas ellas tienen la desventaja de ser sofisticadas a pesar de ser específicas como es el caso de las pruebas inmunológicas. Es por eso que en la práctica rutinaria se prefiere realizar pruebas de actividad en lote, lo cual permite evaluar la capacidad metanógena de un lodo aunado a la biodegradabilidad del agua residual, sin conocer los géneros de bacterias presentes en el lodo (Saval y Noyola, 1992).

**Tabla 1.1.** Géneros de bacterias involucradas en la digestión anaerobia

HIDROLÍTICAS	FERMENTADORAS	SULFATORREDUCTORAS
<i>Clostridium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Desulfomonas</i>
<i>Acetovibrio</i>	<i>Zymomonas</i>	<i>Desulfovibrio</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Desulfobacter</i>
<i>Staphilococcus</i>	<i>Sarcina</i>	<i>Desulfococcus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Selenomonas</i>	<i>Desulfosarcina</i>
ACETOGENICAS SINTRÓFICAS (OHPA)	METANOGENICAS ACETOCLÁSTICAS	METANOGENICAS HIDROGENOFÍLICAS
<i>Sintrophomonas</i>	<i>Methanotrix</i>	<i>Methanobacterium</i>
<i>Syntrophobacter</i>	<i>Methanosarcina</i>	<i>Methanobrevibacterium</i>
	<i>Methanospirillum</i>	<i>Methanoplanus</i>

**1.2.4 Digestión anaerobia en dos etapas.** En algunos casos es conveniente considerar, desde el punto de vista económico y de manejo del proceso,

la separación de las fases acidogénica y metanogénica. Esta posibilidad depende del sustrato y de la necesidad de que exista sintrofia entre las poblaciones acidogénica y metanogénica. Con este sistema se puede evitar la acumulación de ácidos grasos volátiles y la desestabilización del sistema.

Para la separación de fases se emplea una estrategia cinética que tiene en cuenta las diferencias de velocidades de crecimiento entre los organismos acidificantes y metanogénicos (tabla 1.2). Si se mantiene un bajo tiempo de retención celular (TRC) en el primer reactor, las bacterias metanogénicas serán "lavadas" y con TRC largo en el segundo reactor, se favorece el crecimiento de las metanogénicas. (Viñas, 1990 y Monroy, 1998).

**Tabla 1.2.** Velocidades de crecimiento de bacterias acidificantes y metanogénicas.

Bacterias	Tiempo (h)
Fermentativas formadoras de ácidos.	0.5
Metanogénicas consumidoras de H <sub>2</sub> (o formiato).	6.0
Acetogénicas fermentadoras de butirato.	33.6
Acetogénicas fermentadoras de propionato	60.0
Metanogénicas consumidoras de acetato	62.4

La velocidad de reacción de la etapa más lenta es la que controla el proceso, lo que depende de la naturaleza del sustrato, de la configuración del proceso, temperatura y carga del reactor (Monroy, 1998).

Si la metanogénesis es la etapa limitante, la separación de la metanogénesis de la acetogénesis en una segunda etapa puede ser conveniente, debido al efecto adverso

que produce en estas bacterias la acidogénesis. Varios resultados tienden a indicar la sensibilidad del proceso anaerobio a la regulación del hidrógeno, si éste se acumula detiene el proceso de conversión acidogénico y provoca acumulación de ácidos grasos volátiles, por esto debe ser removido por bacterias hidrogenotróficas (metanogénicas o sulfato o nitrato reductoras).

El análisis termodinámico provee un  $\Delta G^0$  favorable para determinada ruta metabólica sintrófica en función de la regulación de la presión parcial del  $H_2$ . En un efluente particular es necesario asociar las predicciones termodinámicas en la etapa de acidificación para el sustrato principal y ver si las reacciones de esta etapa pueden ser afectadas o no de sintrofismo.

La separación de fases puede aislar en parte las reacciones de acidificación de las reacciones que requieren acoplamiento sintrófico. La conversión de ciertos sustratos puede ser beneficiada por la separación de fases, no así aquellas que dependen del sintrófismo (Viñas, 1990).

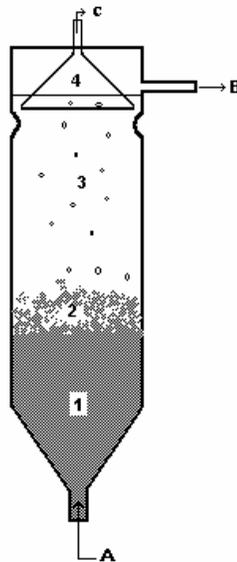
## **1.3 Reactor de lecho de lodos anaerobios de flujo ascendente (UASB).**

El concepto de reactor de lecho de lodos con flujo ascendente (UASB) fue desarrollado en los años 70. Hoy en día el reactor UASB es uno de los reactores más usados para el tratamiento anaerobio de aguas residuales, muchos de estos reactores están en operación en varias partes del mundo (Schmidt y Ahring, 1996).

La implementación del reactor UASB al tratamiento de aguas residuales de origen industrial y doméstico ha sido de mucho éxito, en donde el proceso es de alta tasa, y se basa en mantener un sistema con un tiempo de retención celular (TRC) mucho

mayor que el tiempo de residencia hidráulico (TRH) (Schmidt y Ahring, 1996). Tales características permiten al reactor acumular grandes cantidades de biomasa y consecuentemente soportar grandes cargas orgánicas volumétricas. (Lettinga *et al.*, 1980). El reactor UASB se ha venido utilizando debido a la formación del lodo anaerobio con una alta capacidad de sedimentación y actividad metanogénica. La formación y estabilidad de los gránulos son esenciales para el éxito del reactor ya que esta acción los inmoviliza o fija dentro del reactor (Oliveira de *et al.*, 1997).

El reactor UASB se divide típicamente en cuatro compartimentos: 1) lecho de lodos, 2) zona de expansión (menos densa), 3) el compartimiento de sedimentación y 4) separador gas-sólido (figura 1.6). El lecho de lodos se localiza en la parte inferior del reactor por donde ingresa el agua residual que pasa a través del lecho de lodos (A), aquí los compuestos orgánicos son biológicamente degradados y se produce biogás.



**Figura 1.6** Esquema típico de un reactor UASB.

El biogás arrastra algunos granos y aquellos con una buena capacidad de sedimentación se separan en la zona expandida (Schmidt y Ahring, 1996). Los de menor densidad son arrastrados hasta el separador gas sólido, donde regresan al lecho a través de la zona de sedimentación.

**1.3.1 Gránulos anaerobios.** La formación de gránulos puede ser iniciada por la adhesión bacterial a precipitados inorgánicos tales como sulfato de hierro o fosfato de calcio o por la adhesión entre las mismas bacterias.

La sedimentabilidad de un gránulo depende de la densidad y el tamaño. La concentración y el tipo de sustrato influyen en la formación de los gránulos: a mayor concentración de sustrato el tamaño aumenta (Grotenhuis *et al.*, 1991), los ácidos grasos volátiles, son los mejores sustratos para la formación de gránulos. Las bacterias metanogénicas del género *Methanosaeta* (*methanothrix*) juegan un papel esencial en la granulación; *Methanobrevibacter arboriphilicus* produce polipéptidos extracelulares que inducen la granulación, *Methanosarcina* produce agregados iniciales para formar los gránulos (Veiga *et al.*, 1997).

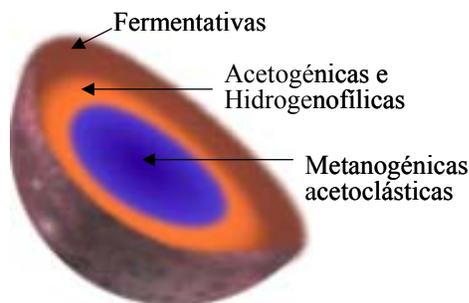
Junto con los microorganismos y partículas, los gránulos están constituidos por una matriz polimérica comúnmente llamada sustancia exopolimérica (Jorand *et al.*, 1998). Los polímeros extracelulares son compuestos de alto peso molecular (P. M. > 10,000) los cuales son producidos por microorganismos bajo ciertas condiciones ambientales (Morgan *et al.*, 1990).

Los polímeros extracelulares juegan un papel esencial en la estructura de los gránulos y en la actividad y funcionamiento de un tratamiento biológico de aguas residuales. Son los encargados de mediar el transporte químico para y desde los microorganismos creando una resistencia difusional para el movimiento del material.

Según Jorand *et al.* (1998) los exopolímeros pueden intervenir en la cohesión del gránulo de dos maneras: 1) a través de cadenas hidrofílicas representadas por polisacáridos creando una matriz en donde la bacteria queda embebida y 2) a través de puentes de unión o puntos reticulares en los polisacáridos representados por heteropolímeros hidrofóbicos. También ofrecen propiedades de intercambio iónico debido a la negatividad de los grupos funcionales de la superficie los cuales permiten la unión de especies catiónicas tales como metales pesados (Zhang *et al.*, 1998).

### 1.3.2 Distribución microbiana en los gránulos. Guiot *et al.* (1992)

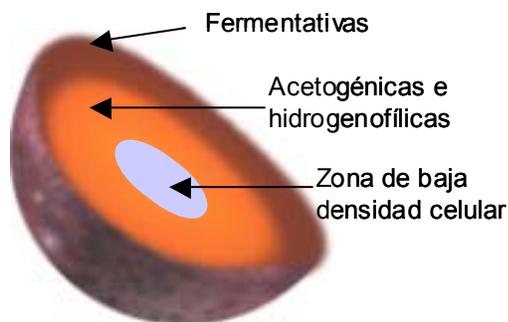
y Fang (1997) sugieren que la distribución microbiana en los gránulos depende del sustrato, diferenciándose tres capas de microorganismos en gránulos alimentados con sustratos ricos en carbohidratos como la sacarosa, con las bacterias fermentativas en la capa externa, las acetogénicas e hidrogenofílicas en la intermedia y las metanogénicas acetoclásticas en el centro del gránulo (ver figura 1.7). Mientras que los gránulos alimentados con sustratos cuya etapa inicial de degradación es lenta, presentan una distribución uniforme (Fang, 1997).



**Figura 1.7** Estructura propuesta del arreglo de la población microbiana dentro del gránulo (Guiot, 1992).

Famá (1997), estudió gránulos anaerobios de cinco reactores UASB industriales los cuales operaban con influentes de composición química compleja (aguas residuales urbanas, del proceso de levaduras, malta, y lácteos), encontrando estratificación en los gránulos de los reactores de los influentes de malta y lácteos, con un centro formado por microorganismos semejantes a *Methanosaeta*. Gránulos uniformes, también fueron encontrados en lodos de reactores de influentes de lácteos, en las aguas urbanas se encontraron gránulos uniformes con centro inorgánico. El lodo del reactor con el influente del proceso de levaduras presentó los dos tipos de gránulos.

En gránulos acidogénicos se observa una baja densidad celular en el centro, esto es el resultado de la inactivación y autólisis de las células del centro debido a la deficiencia de sustrato causada por su baja difusibilidad, esto demuestra que la zona activa para los microorganismos acidogénicos es limitada en profundidad Guiot *et al.* (1992) (figura 1.8).



**Figura 1.8** Distribución microbiana en los gránulos acidogénicos.

## 1.4 *Pseudomonas*.

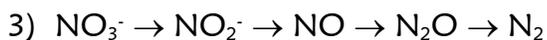
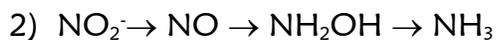
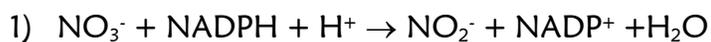
Todos los géneros de este grupo son bacilos Gram-negativos, rectos o poco curvos con flagelos polares. Son aerobios heterotróficos que emplean el O<sub>2</sub> como último aceptor

de electrones y no tienen un metabolismo fermentativo (los organismos fermentativos con flagelo polar en general se clasifican en el género *Aeromonas* o *Vibrio*). Algunas especies, pueden emplear el nitrato como último aceptor de electrones llevándolo a óxido nítrico (NO) o nitrógeno molecular (N<sub>2</sub>) (Stanier, 1966).

**1.4.1 Sustratos de las *Pseudomonas*.** Son microorganismos importantes en la tierra y el agua y es probable que sean responsables de la degradación de muchos compuestos solubles derivados de la descomposición de materiales de plantas y animales. Una de las propiedades más notables de las *Pseudomonas* es la amplia variedad de compuestos orgánicos empleados como fuente de carbono y como donadores de electrones para la producción de energía.

Los hidrocarburos aromáticos sustituidos, monocíclicos y policíclicos, que contiene un anillo de benceno como estructura primaria común y que se encuentran como principales contaminantes del suelo son: benceno, tolueno, etilbenceno, los tres isómeros del xileno (orto, meta y para), antraceno, fenantreno, pireno y naftaleno. Se ha demostrado que estos hidrocarburos aromáticos son susceptibles a la degradación (en condiciones aerobias) por *P. aeruginosa* y *P. putida*, debido al tipo de oxigenasa que poseen cada una (Stanley, 1986).

*P. aeruginosa* puede utilizar el nitrato como única fuente de nitrógeno para su crecimiento (asimilación del nitrato) y también puede desarrollarse bajo condiciones anaerobias utilizando el nitrato como aceptor de electrones proveyendo una vía para la fosforilación oxidativa (respiración del nitrato). Para la asimilación del nitrato, primero éste es reducido a amonio (1 y 2) el cual es asimilado junto con los compuestos orgánicos, pero en la respiración del nitrato este es reducido a nitrito y subsecuentemente a nitrógeno u óxidos de nitrógeno (3).



La respiración del nitrato depende en las actividades de las nitrato y nitrito reductasas, las cuales son producidas bajo condiciones anaerobias en presencia del nitrato. La respiración con nitrato no se da en ambientes aerobios en donde el oxígeno es requerido para las reacciones metabólicas iniciales (Clarke y Richmond, 1975).

#### **1.4.2 *Pseudomonas aeruginosa* cepa M113.** Soberón *et al.*, (1996)

aislaron una mutante de *Pseudomonas aeruginosa*, la cual es capaz de crecer a expensas del alquilbencen sulfonato ramificado logrando degradar hasta un 70% del surfactante en condiciones microaerofílicas a 30°C sin agitación, además de resistir grandes concentraciones.

La capacidad degradativa para el surfactante, se demostró que se encuentra codificada en un plásmido ya que se pudo transferir por conjugación a otra *Pseudomonas* y a una *E. coli*. La cepa fue capaz de utilizar el  $\text{NO}_3^-$  como aceptor de electrones lo que la convierte en un buen candidato para ser utilizada en condiciones anóxicas para la degradación de la materia orgánica.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Los surfactantes están entre los productos más versátiles de la industria química; tal diversidad se debe a que se utilizan en la fabricación de productos tales como aceites de motor, productos farmacéuticos, en detergentes para lavanderías y caseros, en la perforación de pozos petroleros y recientemente en el lavado de suelos contaminados. En una molécula sencilla, un surfactante combina un grupo fuertemente hidrofóbico con un grupo fuertemente hidrofílico. Dependiendo de la naturaleza del grupo hidrofílico, los surfactantes se clasifican en: aniónicos, catiónicos, Zwitteriónicos y no iónicos (Rosen, 1978).

Los surfactantes son los ingredientes limpiadores de mayor consumo; los más empleados incluyen al alquilbencen sulfonato lineal (LAS), el alcohol etoxilato lineal y el monoalquilamonio cuaternario (Federle y Schwab, 1992). Un detergente común usado en el agua, deja niveles de surfactante en el intervalo de 1 a 20 mg·L<sup>-1</sup> (APHA, 1989), sin embargo, en aguas residuales provenientes de industrias productoras de detergentes existen concentraciones de surfactante por arriba de los 300 mg·L<sup>-1</sup> (Wagener y Schink 1987).

Resulta tóxico para algas, larvas de invertebrados, estados embrionarios de peces, etc. (Lewis y Hamm 1986; Lewis, 1991; Lewis, 1992) El rango de toxicidad en el ambiente provocado por LAS es de 0.1 a 100 mg/L, (Tabor y Barber, 1996).

Desde hace ya varias décadas se han venido utilizando procesos biológicos para el tratamiento de aguas residuales de origen doméstico e industrial. En general estos

## 2. Justificación.

---

procesos se utilizan cuando la materia orgánica contenida en el agua residual es biodegradable, lo que permite explotar la capacidad de un sin número de microorganismos para digerir compuestos orgánicos complejos transformándolos en moléculas más sencillas como metano y CO<sub>2</sub> (Saval y Noyola, 1992).

Básicamente existen dos tipos de procesos biológicos para el tratamiento de aguas residuales, los aerobios y los anaerobios. En los procesos aerobios es necesario suministrar oxígeno para favorecer la degradación de la materia orgánica, lo que se traduce en altos consumos de energía además de la generación de grandes cantidades de material celular que debe ser tratado para su disposición.

Los procesos anaerobios no requieren suministro de energía, por el contrario, generan un biogás con alto contenido de metano que puede ser utilizado como energético, adicionalmente, la producción de material celular es baja por lo que se reduce notablemente el problema de la disposición final de lodos de purga (Saval, 1993).

Un proceso anaerobio es un proceso complejo constituido por un conjunto de reacciones consecutivas y paralelas, biocatalizadas por diferentes especies de microorganismos (Guyot, 1990; Viñas, 1994).

Los alquilbencen sulfonato lineales (LAS) son los surfactantes de mayor consumo en el mundo. Aunque son completamente biodegradados en plantas de tratamiento de agua residual (Prats *et al.*, 1997), se ha demostrado que este compuesto no se mineraliza bajo condiciones anaerobias (Federle y Schwab, 1992), además de que inhibe la metanogénesis (Maurer *et al.*, 1965; Wagener y Schink, 1987; Krueger *et al.*, 1998).

## 2. Justificación.

Una forma de mejorar estos procesos anaerobios es la de utilizar microorganismos que posean la capacidad de biodegradar compuestos recalcitrantes para introducir una nueva actividad microbiana en los conglomerados de microorganismos nativos.

En el presente trabajo se utilizó la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* M113, la cual es resistente a cloramfenicol, a sales de mercurio y degrada por vía aerobia hasta 70% de alquilbencen sulfonato ramificado (Soberón *et al.*, 1996). Puede crecer bajo condiciones anóxicas usando  $\text{NO}_3^-$  como aceptor de electrones, habiéndose demostrado que degrada hasta 80% de LAS bajo estas condiciones (García, 1997). Se evaluó la degradación de LAS en un sistema anaerobio en dos etapas, la acidogénica y la metanogénica. La M113 se inoculó y se monitoreó en los lodos del reactor acidogénico.

Los procesos anaerobios se han convertido en uno de los procedimientos más adecuados para el tratamiento de aguas residuales, especialmente aquellas con alta concentración en carga orgánica y las de origen industrial. El tratamiento anaerobio de aguas contaminadas posee ventajas importantes sobre los sistemas aerobios. A pesar de ello se dispone de limitada información sobre la toxicidad de la mayoría de los compuestos de uso o producción industrial sobre este proceso (Wolf de y Feijtel, 1998).

Una forma de evitar la inhibición de la metanogénesis es la separación de la digestión anaerobia en dos etapas, acidogénica y metanogénica, ya que las bacterias acidogénicas son las que resisten en mayor grado el LAS. Una forma de mejorar este sistema es bioaumentando con la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* M113, permitiendo así una primera biodegradación parcial en la primera etapa y su completa mineralización en la etapa metanogénica.

## 3. OBJETIVOS

### General

Estudiar la degradación del surfactante alquilbencen sulfonato de sodio (LAS) y carbohidratos por digestión anaerobia en dos etapas, aumentando la fase acidogénica con una cepa mutada de *Pseudomonas aeruginosa* que es capaz de utilizar el LAS como fuente de carbono.

### Específicos

- Adaptar la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* M113 en un reactor acidogénico alimentado con lactosa y LAS.
- Medir su capacidad para fijarse en la población acidogénica.
- Encontrar las condiciones de operación para lograr la máxima degradación de LAS en los reactores acidogénico y metanogénico conectados en serie manteniendo la cepa M113 dentro del primer reactor.

# 4. MATERIAL Y MÉTODOS

## 4.1 Material

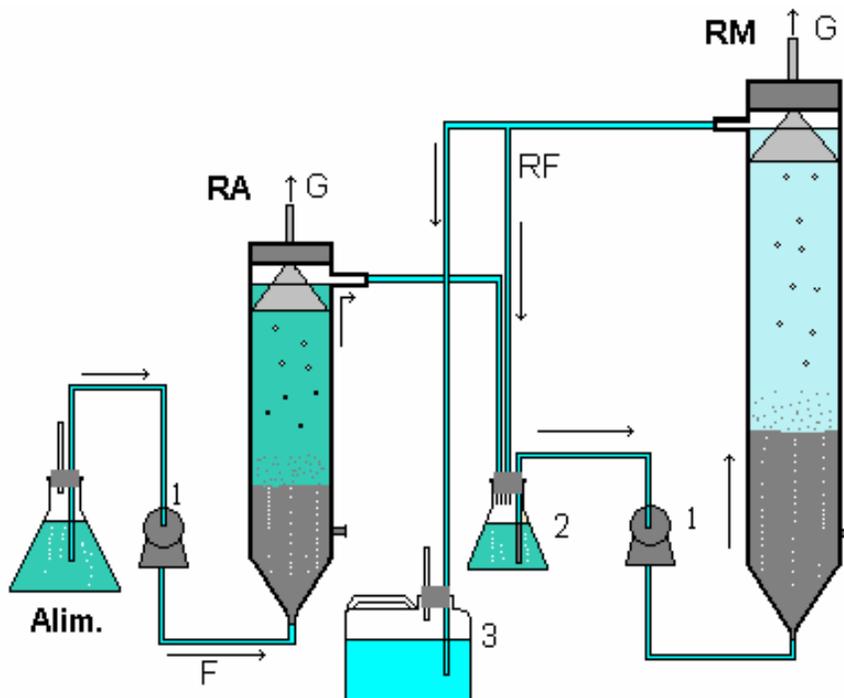
**4.1.1. Medios del cultivo.** El medio de alimentación de los reactores fue el medio mineral RAAM (Shelton y Tiedje, 1984) con lactosa y LAS (LAS 45 de Hoechst. Tiene un 45 %  $\pm 1$  de ingrediente activo, y su peso molecular promedio es de 346 g) como fuentes de carbono y  $\text{KNO}_3$  como aceptor de electrones ( $\text{KNO}_3$  PM 101.108 grado reactivo de Baker) (ver anexos).

El medio empleado para la propagación de la cepa M113 fue el Luria (LB) al cual se le adicionó  $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de cloramfenicol y  $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de  $\text{HgCl}_2$  para asegurar la especificidad del medio a la cepa M113 (ver anexos). El medio base para las pruebas de toxicidad fue el medio RAAM incompleto, utilizando en este caso solo las soluciones 1 y 2 (ver anexos).

**4.1.2 Reactivos.** Todas las sustancias químicas usadas en este trabajo fueron de las compañías Sigma, Merck o Baker, con pureza grado reactivo.

**4.1.3 *Pseudomonas aeruginosa* cepa M113.** De acuerdo con Soberón *et al.* (1996), la *Pseudomonas aeruginosa* (M113) degrada 70% de alquilbencen sulfonato ramificado, es resistente a cloramfenicol (Cm) y a cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ), y es sensible a tetraciclina, rifampicina, kanamicina y estreptomicina.

**4.1.4 Reactores.** En los experimentos de la degradación de LAS en continuo se trabajó con dos reactores UASB conectados en serie para separar la digestión anaerobia en dos etapas: la etapa acidogénica y metanogénica, ver figura 4.1. Los reactores se mantuvieron en un cuarto a temperatura controlada a 35°C. El volumen de operación del reactor acidogénico fue 0.34 L y el del metanogénico de 1.35 L.



**Figura 4.1** Sistema de reactores en serie de la digestión anaerobia en dos etapas. Reactor acidogénico (RA), reactor metanogénico (RM), 1. Bombas peristálticas, 2. Matraz de recirculación, 3. Recipiente para la salida del reactor metanogénico, salida de gas (G), alimentación (Alim) y Recirculación (RF).

## 4.2 Métodos analíticos

**4.2.1 Biomasa.** La biomasa de la cepa M113 se midió por densidad óptica a 600 nm. Se realizó una curva estándar de biomasa en  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  contra densidad óptica. Se tomó

un cultivo con la cepa propagada y se realizaron diluciones con medio de cultivo fresco.

Se midió densidad óptica a 600 nm a cada una de las diluciones y se le determinó la biomasa filtrando 30 mL de cada dilución en filtros millipore de 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, previamente puestos a peso constante (ver anexos).

**4.2.2 Unidades formadoras de colonias (UFC).** La cuenta de la cepa M113 se determinó en los lodos del reactor acidogénico, mediante el siguiente procedimiento:

Se tomó un mL de muestra, y se sonicó por 1 minuto con el fin de remover “la M113” del lodo. En tubos de tapón de rosca con 9 mL de solución salina fisiológica (0.9% de NaCl) se hicieron las diluciones desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ . El medio de cultivo sobre cajas petri constó de agar bacteriológico, de las soluciones 1 y 2 del medio RAAM y  $0.7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glucosa y  $0.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de LAS (como fuente de carbono) con  $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de cloramfenicol (se adicionó cuando el medio estuvo a  $45^\circ\text{C}$  aproximadamente) y  $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$   $\text{HgCl}_2$  (ver anexos).

Se sembraron 0.1 mL de las diluciones en las cajas petri (el experimento se realizó por triplicado) y se incubaron a  $35^\circ\text{C}$  por 1 o 2 días. Se seleccionó la placa cuya cuenta fluctuó entre 30 y 300 UFC. El número de colonias se multiplicó por el recíproco de la dilución y el resultado se multiplicó por 10 para así obtener las Unidades Formadoras de Colonias por mililitro de lodo ( $\text{UFC}/\text{mL}_{\text{lodo}}$ )

**4.2.3 Demanda química de oxígeno.** Se determinó mediante la técnica de reflujó cerrado (APHA, 1989), modificada por Wilson *et al.*, (1989). Las muestras fueron leídas a una longitud de onda de 620 nm.

Se tomaron las muestras; una en la salida del reactor acidogénico y la otra en la salida del reactor metanogénico, luego de esas muestras se tomaron 2 mL de muestra, se les adicionó 1 ml de solución digestora de  $K_2Cr_2O_7$  y 2 mL de ácido sulfúrico con sulfato de plata, posteriormente se homogenizaron con ayuda del vortex, y finalmente los tubos con las muestras se colocaron en horno a  $150^{\circ}C$  durante 2 horas, se dejaron enfriar y se registró la absorbancia a 620 nm. Haciendo uso de la curva estándar se determinaron los  $mg \cdot L^{-1}$  de DQO (ver anexos).

#### **4.2.4 Determinación de alquilbencen sulfonato de sodio**

**LAS.** Se realizó mediante la técnica de sustancias activas al azul de metileno SAAM (APHA, 1989). Las muestras se tomaron de los efluentes de los dos reactores, así como de los lodos de alimentación.

Se tomó 1 mL de muestra y se diluyó hasta 100 mL con agua destilada. Esta solución se transfirió a un embudo de separación y se le agregó unas gotas de fenoftaleína como indicador. Después se alcalinizó con NaOH 1N hasta la aparición del color rosa y se acidificó usando  $H_2SO_4$  1N (fenoftaleína sin color). Posteriormente se agregaron 25 mL de azul de metileno y 10 mL de cloroformo, se agitó vigorosamente por 30 segundos y se dejó reposar para separar las fases. Por último se recolectó la fase orgánica (cloroformo-SAAM). Este paso se repitió 3 veces.

La fase acuosa se desechó y la fase recolectada se resuspendió en un embudo de separación junto con 50 mL de la solución de lavado. Se agitó vigorosamente por 30 segundos y se separaron las fases. Se añadieron 10 mL de cloroformo y se agitó de nuevo para obtener la separación de fases; este paso se repitió 2 veces. La fase orgánica y las sustancias activas al azul de metileno se aforaron a 100 mL con cloroformo y se registró la absorbancia a 652 nm contra un blanco de cloroformo. La

concentración de SAAM se determinó empleando una curva estándar previamente realizada (ver anexos).

Después de la etapa de lavado el surfactante se determinó por cromatografía líquida de alta presión HPLC. Se empleó un equipo de Termo Separation Products integrado por: una columna de Waters C18 5  $\mu\text{m}$  spherical de 3.9 por 300 mm de longitud, un inyector manual TSP #20709, bombas constaMetric 4100 TPS # 920558001 y constaMetric 3500 TPS # 92055, un detector serial UV spectroMonitor 5000 TPS # 920552. Las condiciones de operación fueron:

Fase móvil	Acetonitrilo: agua 80:20
Flujo	1mL·min <sup>-1</sup>
Tiempo de retención	3.5 min
Presión	2900 psi
Longitud de onda $\lambda$	235 nm
Rango	1

Las muestras se centrifugaron a 10 000 rpm por 10 min, el sobrenadante se filtró con una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro. La concentración de surfactante se obtuvo con el empleo de una curva estándar previamente realizada (ver anexos).

Para determinar los LAS en los lodos, se realizó una extracción con una solución de acetonitrilo:agua 80:20. Se tomó un mL de lodo y se le agregaron 3 mL de la solución de lavado; se sonicó por 30 min. y después se centrifugó por 10 minutos, el sobrenadante se recolectó y el precipitado se resuspendió de nuevo con 3 mL de la solución y se le aplicó el mismo procedimiento por dos veces más. Las muestras pueden ser analizadas por los dos métodos ya sea por SAAM o por HPLC. La

concentración del surfactante en los lodos se determinó empleando la siguiente fórmula:

$$\frac{mg_{LAS}}{g_{SSV}} = \left| \frac{mg_{LAS}}{L_{lavado}} \right| \left| \frac{L_{lavado}}{L_{lodo}} \right| \left| \frac{L_{lodo}}{L_{reactor}} \right| \left| \frac{L_{reactor}}{g_{SSV}} \right|$$

En dónde:

$mg_{LAS}$  = mg de alquilbencen sulfonato de sodio LAS

$g_{SSV}$  = gramos de Sólidos Suspendidos volátiles.

$L_{lavado}$  = Litros de lavado.

$L_{lodo}$  = litros de lodos.

$L_{reactor}$  = Litros de reactor.

#### **4.2.5 Determinación de ácidos grasos volátiles (AGV).** Esta

técnica se realizó por cromatografía de gases, utilizando un cromatógrafo Hewlett Packard 5890, series II.

Condiciones de operación del cromatógrafo.

Temperatura de columna = 120 °C.

Temperatura del inyector = 130 °C

Temperatura del detector = 150 °C

Columna capilar superox FA de 10 metros, fase AT 1000. Altech N° 955110

N<sub>2</sub> = 3 mL·min<sup>-1</sup>, H<sub>2</sub> = 30 mL·min<sup>-1</sup> y Aire 300 mL·min<sup>-1</sup>.

Volumen de inyección 0.2 µL.

Las muestras se recolectaron de los efluentes de ambos reactores. La determinación de AGV se realizó por el método de calibración con estándar interno, el cual se basa sobre

la relación que existe entre la concentración del compuesto y la del estándar interno. Se debe de tener precisión en los volúmenes de trabajo.

$$\frac{M_i}{M_c} = \frac{(C_i * V_i)}{(C_c * V_i)}$$

Independiente del volumen de inyección el integrador nos da:

$$C_c = \left( F1 * \frac{A_c}{A_i} \right) * C_i$$

En dónde:

M<sub>i</sub>= Masa del estándar interno inyectado.

M<sub>c</sub>= Masa del compuesto inyectado.

V<sub>i</sub>= Volumen de inyección.

F1= Factor de calibración, dado por el integrador.

C<sub>i</sub>= Concentración del estándar interno.

C<sub>c</sub>= Concentración del compuesto.

A<sub>i</sub>= Area del pico del estándar interno.

A<sub>c</sub>= Area del pico del compuesto.

Se tomó un volumen de 950 µL de muestra y se vertió en un eppendorf, y se adicionaron 50 µL de una solución de ácido clorhídrico al 50 % más ácido isovalérico 60 mM, posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos en una microcentrifuga eppendorf. El sobrenadante se transfirió a un vial limpio, se tomaron 0.2 µL y se inyectaron al cromatógrafo. La concentración de los AGV's se obtuvo directamente del integrador del equipo el cual calcula la concentración en base a factores que obtiene después de haber inyectado los respectivos estándares.

**4.2.6 Determinación de metano y bióxido de carbono.** Se determinó por cromatografía de gases, utilizando un cromatógrafo Gow-Mac series 550. Las condiciones de operación fueron:

Temperatura de la columna = 140 °C

Temperatura del detector = 190 °C

Temperatura del inyector = 170 °C

Corriente de los filamentos = 120 mA

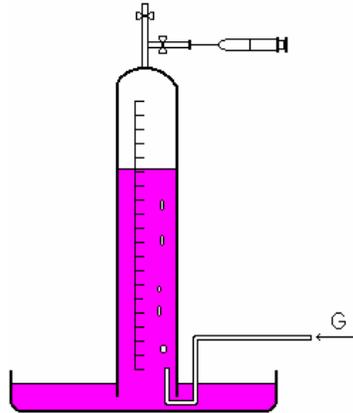
Presión del Helio = 40 psi

Flujo del Helio = 25 mL·min<sup>-1</sup>.

Empaque de la columna Carbosphere 80/100

El biogás se midió mediante la técnica de desplazamiento de una solución saturada de NaCl (300 g·L<sup>-1</sup>), ajustada a un valor de pH < 5 para impedir la disolución de CO<sub>2</sub>. A esta solución se le agregó rojo de metilo como indicador de cambio de pH por disolución de H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. El volumen desplazado se midió en una columna precalibrada cada 24 horas. El biogás producido se ajustó a condiciones estándar de presión y temperatura tomando como 0.8 atm la presión atmosférica y 35°C la temperatura del sistema.

Para la cuantificación del metano y CO<sub>2</sub> se tomó 1 mL de muestra con jeringa desechable según se observa en la figura 4.2. La aguja de la jeringa se tapó con un septo para evitar el escape del biogás. Se inyectaron 0.1 mL de muestra en el cromatógrafo de gases y la fracción del metano y CO<sub>2</sub> se determinó con la ayuda de la curva estándar (ver anexos).



**Figura 4.2** Medidor de biogás y punto de toma de muestra. Entrada de biogás (G).

**4.2.7 Cuantificación de  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ .** Los iones nitrato y nitrito se midieron por electroforesis utilizando un analizador capilar de iones (CIA) Water Quanta 4000, empleando una columna microcapilar (fused silica, 50 cm de 75  $\mu\text{m}$ ). Las condiciones del CIA son: una aplicación de 20 KV, 38  $\mu\text{A}$  y longitud de onda de 240 nm.

Las muestras se tomaron de las salidas de ambos reactores así como de la alimentación; se centrifugaron a 12,000 rpm por 10 min. y se filtraron en una membrana de celulosa de 0.45  $\mu\text{m}$ . Posteriormente se pasaron a viales eppendorf de 0.5 mL para montarlos en el carrito automático del equipo y analizarlas. La concentración de los iones se determinó con la ayuda de una curva estándar previamente realizada (ver anexos).

**4.2.8 Sólidos.** Los sólidos se determinaron de los lodos de ambos reactores. Se lavaron perfectamente los crisoles y se calentaron en la mufla a 550 °C durante una hora; de ahí se pasaron al desecador para que se enfriaran antes de pesarlos. Este paso

se realizó hasta que el crisol permaneció en peso constante. Una vez obtenido este peso, se registró como “peso del crisol”. Se tomaron 5 mL de lodo de ambos reactores y se colocaron en el crisol, después se evaporó el líquido de la muestra en una parrilla a temperatura baja para evitar derramamientos.

Posteriormente se colocaron los crisoles en una estufa a temperatura de 103 – 105°C durante una hora y se pasaron al desecador, se pesaron y se anotó este peso como “peso seco a 105°C”. Los residuos, se calcinaron a 550 °C durante 30 minutos, se transfirieron a la estufa de 103 –105°C durante 30 minutos y se pasaron al desecador, tomándose este peso como “peso de la ceniza seca”. Una vez obtenidos los tres pesos, se procedió a determinar los sólidos totales, fijos y volátiles de la siguiente manera:

$$\text{Sólidos Totales (g}\cdot\text{L}^{-1}) = \left( \frac{\text{Peso de muestra seca} - \text{Peso del Crisol}}{\text{Volumen de Muestra}} \right)$$

$$\text{Sólidos fijos (g}\cdot\text{L}^{-1}) = \left( \frac{\text{Peso de ceniza seca} - \text{Peso del Crisol}}{\text{Volumen de Muestra}} \right)$$

$$\text{Sólidos Volátiles (g}\cdot\text{L}^{-1}) = (\text{Sólido Totales} - \text{Sólidos Fijos})$$

**4.2.9 Análisis de microscopía electrónica de barrido.** Se tomo un mL de lodo acidogénico y se introdujo en un tubo eppendorff para su tratamiento de acuerdo a la siguiente metodología.

- a) Fijación con glutaraldehído al 5% (24 horas a temperatura ambiente).
- b) Lavado con disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M hasta la desaparición del olor a glutaraldehído.

- c) Fijación con tetróxido de osmio (2 horas en refrigeración).
- d) Lavado con disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M.
- e) Deseccación con acetona al 30, 40, 50, 70, 80 y 90% y grado absoluto. Cada disolución se añadió por duplicado, con un tiempo de reposo de 15 minutos a excepción de la acetona absoluta, la cual tuvo un tiempo de reposo de 20 minutos.
- f) Deseccación al punto crítico.
- g) Tinción con carbón y oro.
- h) Observación al microscopio electrónico de barrido.

### **4.3 Propagación de *Pseudomonas aeruginosa* M113.**

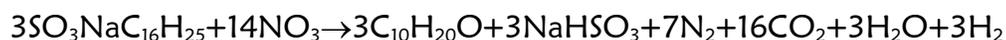
La bacteria, proporcionada por la Dra. Gloria Soberón del Instituto de Biotecnología de la UNAM, se propagó con el fin de obtener la biomasa necesaria para la inoculación del reactor acidogénico. De la cepa M113, desarrollada en agar nutritivo Luria (LB), se tomó una muestra mediante punción de una de sus colonias aisladas, transfiriéndose a 3 mL de medio LB con de  $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Cm y  $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  HgCl<sub>2</sub> y se incubó a 35°C por 72 horas. En seguida se procedió a su reinoculación en medio fresco hasta obtener un volumen de cultivo de 2 L con una concentración de biomasa de  $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  en peso seco.

Los dos litros de la cepa M113 se conectaron en la alimentación del reactor acidogénico y se mantuvo en recirculación durante 5 días (20 TRH), con la finalidad de asegurar su permanencia en el reactor. Se midieron unidades formadoras de colonia en el efluente y en los lodos.

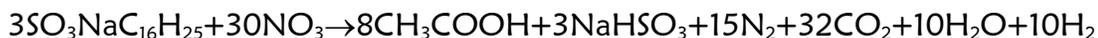
## 4.4 Pruebas de crecimiento a diferentes concentraciones de LAS:NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

**4.4.1 Condiciones de desnitrificación (anóxicas).** Con el fin de saber el comportamiento de la cepa M113 utilizando LAS como única fuente de carbono, se realizaron cultivos con 20, 50, 100 y 150 200 y 400 mg·L<sup>-1</sup> de LAS:NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en una proporción 1:1 de acuerdo al nitrato necesario para lograr la degradación primaria de LAS en los productos decanol, acetato, propionato y butirato conforme a las ecuaciones estequiométricas listadas abajo. En todos los cultivo se utilizó al medio mineral RAAM como medio base.

Para el producto decanol



Para el producto acetato



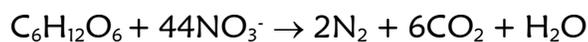
Para el producto propionato



Para el producto butirato



La cepa M113 se cultivó en botellas serológicas con 60 mL de medio de cultivo a 35 °C sin agitación. El volumen del inóculo fue del 20% del volumen de medio de cultivo con la cepa propagada en medio LB, quedando en 72 mL de medio de cultivo en total. Cada concentración de LAS se realizó por triplicado. En los controles se llevó a cabo el mismo procedimiento, solo que la glucosa fue la fuente de carbono. Se agregó nitrato en proporción estequiométrica de acuerdo a la siguiente ecuación:



Que nos indica que para la degradación de la glucosa se necesitan 1.37 g  $\text{NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1}$  glucosa, y en este caso se utilizaron 5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  de glucosa y 6.85  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  de  $\text{NO}_3^-$ . El crecimiento se midió por densidad óptica a 600 nm. La concentración de LAS se midió al inicio y al final de la cinética.

**4.4.2 Condiciones aerobias.** Esta se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 200 mL con 120 mL de medio a 35 °C y con una agitación de 200 revoluciones por minuto (RPM). Las concentraciones de LAS probadas fueron de 200 y 400  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de LAS. El volumen del inóculo consistió de 20 mL del medio de cultivo LB con la cepa propagada (20%) para obtener un volumen final de 120 mL. Para cada concentración de LAS se realizaron triplicados. El medio control se trató bajo las mismas condiciones, utilizando 5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  de glucosa como fuente de carbono.

**4.4.3 Longitud de la bacteria M113.** Las mediciones morfométricas de la célula bacteriana se llevaron a cabo mediante la técnica de procesamiento de imágenes, utilizando el programa IMAGE-PRO PLUS Versión 4.1 (Media Cybernetics, USA). El equipo constó de un microscopio conectado a una cámara de circuito cerrado, la cual enviaba la señal a una computadora equipada con una tarjeta digitalizadora y un coprocesador matemático, tras lo cual aparecía la imagen en un monitor. Las mediciones se realizaron manualmente, moviéndose el campo del microscopio y capturando las células.

Los tratamientos analizados fueron 200 y 400  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de LAS a las 32 horas, así como también el control de glucosa para ambas condiciones en el mismo tiempo. En total se realizaron 50 mediciones de longitud por cada tratamiento.

## 4.5 Coeficiente específico de crecimiento ( $\mu$ ).

El coeficiente específico de crecimiento para *Pseudomonas aeruginosa* M113, se obtuvo con la siguiente ecuación (Pirt, 1985):

$$\mu = \frac{dx}{dt} \cdot \frac{1}{x}$$

En donde  $dx/dt$  expresa la velocidad de crecimiento de la población y  $X$  la concentración de biomasa en  $g \cdot L^{-1}$ .

## 4.6 Estudios de biodegradación en continuo.

El estudio se llevó a cabo durante 256 días en continuo, con dos corridas a dos concentraciones de LAS:  $20 \text{ mg} \cdot L^{-1}$  LAS (Figura 5.9a) y  $50 \text{ mg} \cdot L^{-1}$  LAS (Figuras 5.9b y 5.9d). En los primeros 17 días el sistema se alimentó con el medio de  $20 \text{ mg} \cdot L^{-1}$  de LAS. Una vez que la eficiencia en la eliminación de LAS estuvo por arriba del 50%, se decidió aumentarla a  $50 \text{ mg} \cdot L^{-1}$  hasta el día 52 en donde se observó una acumulación de LAS en los lodos de ambos reactores y un esponjamiento de los mismos en el reactor metanogénico.

Para estudiar la recuperación de la actividad acidogénica del reactor se suspendió la alimentación de LAS (Figura 5.9c).

Al reactor metanogénico se le cambió la tasa de recirculación de 0 a 7 a partir del día 90 para mejorar la remoción del LAS de los lodos. Cuando el reactor metanogénico llegó hasta una eficiencia del 96% en la eliminación de la DQO se volvió alimentar al sistema con  $50 \text{ mg} \cdot L^{-1}$  de LAS: $NO_3^-$ .

Ya que se volvió a alimentar al sistema con LAS se monitorearon los ácidos grasos volátiles y el nitrato, para así tener un mejor entendimiento de cómo el LAS afecta la digestión anaerobia.

**4.6.1 Condiciones de operación de los reactores.** Las condiciones de operación de ambos reactores UASB fueron las siguientes: para el reactor acidogénico un tiempo de residencia hidráulica (TRH) de 6 h, ya que en este tiempo es donde existe una mayor conversión de la DQO en ácidos grasos volátiles (Monroy, 1998) con un volumen de operación de 340 mL y para el reactor metanogénico un TRH de 24 h con un volumen de 1350.

#### 4.6.2 Cálculos para reactores continuos.

Tiempo de Residencia Hidráulica (TRH).

$$\text{TRH} = \frac{\text{volumen del reactor (L)}}{\text{gasto de alimentación (L}\cdot\text{d}^{-1})} = \frac{V}{F} \equiv [\text{d}]$$

Tasa de dilución.

$$D = \frac{F}{V} = \frac{1}{\text{TRH}} \equiv [\text{d}^{-1}]$$

Tasa de recirculación.

$$R = \frac{\text{Gasto recirculación}}{\text{Gasto alimentación}} = \frac{RF}{F}$$

Eficiencia de Remoción de Carga Orgánica.

$$\eta_{\text{DQO}} = \text{Ef. Rem.} = \frac{(\text{DQO}_{\text{entrada}} - \text{DQO}_{\text{salida}}) (\text{g}\cdot\text{L}^{-1})}{\text{DQO}_{\text{entrada}} (\text{g}\cdot\text{L}^{-1})} = \frac{S_0 - S}{S_0}$$

Carga Orgánica Volumétrica (Bv).

$$Bv \left( \frac{\text{g DQO}_{\text{entrada}}}{\text{L} \cdot \text{d}} \right) = \frac{\text{DQO}_{\text{entrada}} (\text{g} \cdot \text{L}^{-1})}{\text{TRH} (\text{d})} = \frac{S_0}{\text{TRH}}$$

Carga másica.

$$Bx = \frac{\text{gDQO}}{\text{gSSV} \cdot \text{d}} = \frac{Bv}{X}$$

Actividad Específica.

$$A_{sp} = Bx \cdot \eta_{\text{DQO}}$$

Gasto de Biogás Producido a condiciones STP.

$$Q \left( \frac{\text{L}}{\text{L} \cdot \text{d}} \right) = \frac{\text{Volumen de biogás (L)}}{V \cdot \Delta T (\text{d})} \times \frac{0.8 \text{ atm}}{1 \text{ atm}} \times \frac{273^\circ \text{ K}}{308^\circ \text{ K}}$$

Donde:

$\Delta T$  (días) = Tiempo entre dos mediciones.

0.8 atm = Presión atmosférica en la Ciudad de México.

308° K = Temperatura de operación del reactor.

Metano medido experimentalmente.

$$Q_{\text{CH}_4\text{e}} = \left( \frac{\text{L}}{\text{L} \cdot \text{d}} \right) = Q \cdot \%y_{\text{CH}_4}$$

Donde:

$\%y$  = Composición molar de metano en el biogás medido por cromatografía.

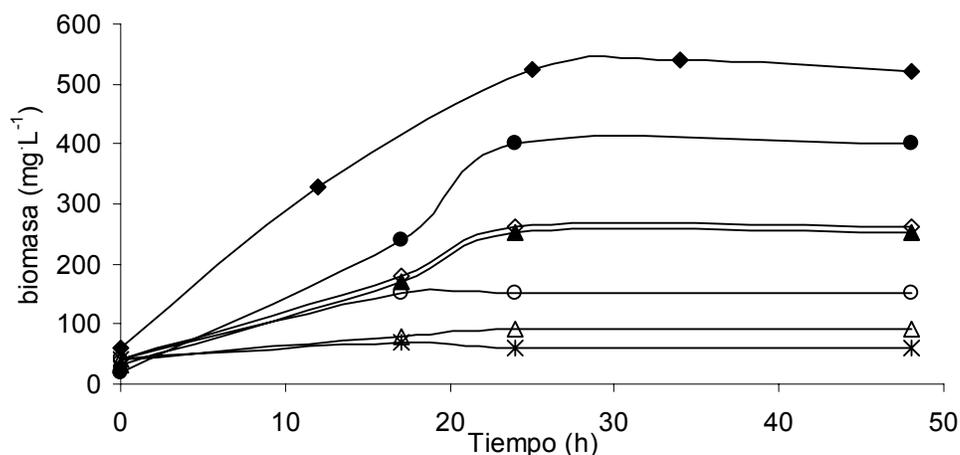
Metano teórico.

$$Q_{\text{CH}_4\text{T}} = \frac{F}{V} (S_0 - S) \cdot \eta \cdot 0.34 \frac{L_{\text{CH}_4}}{g\text{DQO}}$$

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

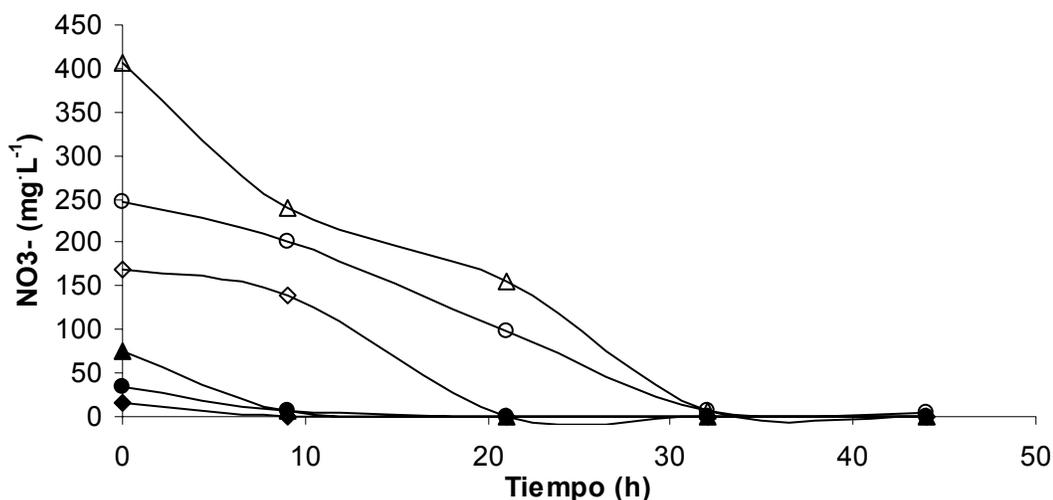
### 5.1 Efecto del surfactante LAS en el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* cepa M113.

La cepa M113 fue capaz de desarrollarse en medio adicionado con el surfactante LAS como única fuente de carbono, utilizando al  $\text{NO}_3^-$  como aceptor de electrones en condiciones anóxicas. En la figura 5.1 se muestra el comportamiento de la bacteria a diferentes concentraciones de LAS, en dónde se observa una disminución en la producción de biomasa a medida que se incrementó la concentración del surfactante.



**Figura 5.1** Cinética de crecimiento de la cepa M113 bajo condiciones anóxicas a diferentes concentraciones de LAS como fuente de carbono y empleando al  $\text{NO}_3^-$  como aceptor de electrones (35 °C LAS: $\text{NO}_3^-$  = 1:1), (◆ glucosa 400 mg·L<sup>-1</sup>, ● LAS 20 mg·L<sup>-1</sup>, ▲ LAS 50 mg·L<sup>-1</sup>, ◇ LAS 100 mg·L<sup>-1</sup>, ○ LAS 150 mg·L<sup>-1</sup>, △ LAS 200 mg·L<sup>-1</sup> y \* LAS 400 mg·L<sup>-1</sup>).

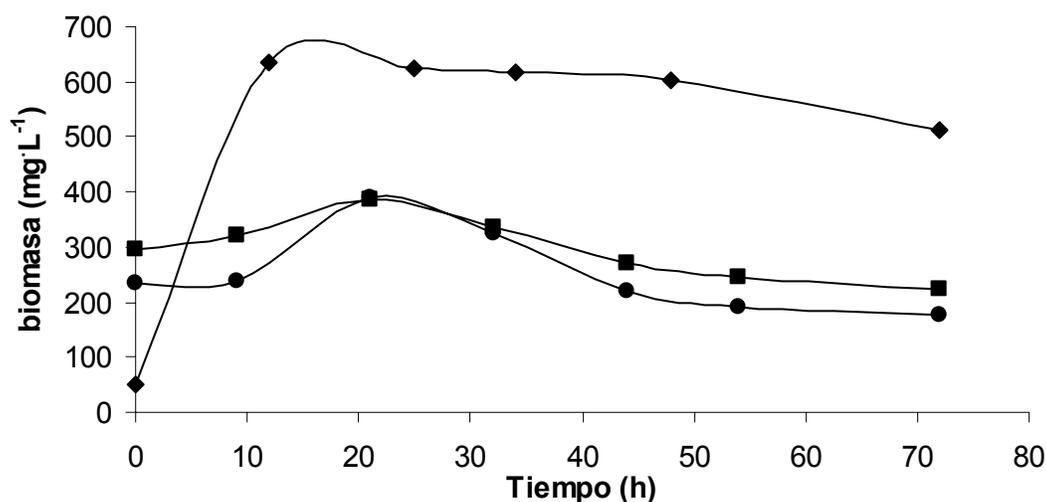
Por otro lado, en el medio control (glucosa 400 mg·L<sup>-1</sup>), la mayor producción de biomasa se alcanzó a las 24 horas (525 mg·L<sup>-1</sup> en peso seco). El nitrato, empleado en una relación nitrato:LAS 1:1, fue consumido en su totalidad a las 32 horas (figura 5.2).



**Figura 5.2** Consumo de nitrato en una relación 1:1 con el LAS en condiciones anóxicas (35 °C). NO<sub>3</sub><sup>-</sup> mg·L<sup>-1</sup>: (◆ 20, ● 50 ▲ 100, ◇ 150, ○ 200, y △ 400).

Al cultivar a la cepa M113 en condiciones aerobias a 200 y 400 mg·L<sup>-1</sup> de LAS, se observó una disminución de la biomasa a partir de las 32 horas; este comportamiento se debió principalmente a la agitación (Soberón *et al.*, 1996) requerida para obtener las condiciones aerobias. Por otro lado, utilizando un control con 400 mg·L<sup>-1</sup> de glucosa como fuente de carbono, se observó una producción de 630 mg·L<sup>-1</sup> en peso seco a las 12 horas (Figura 5.3).

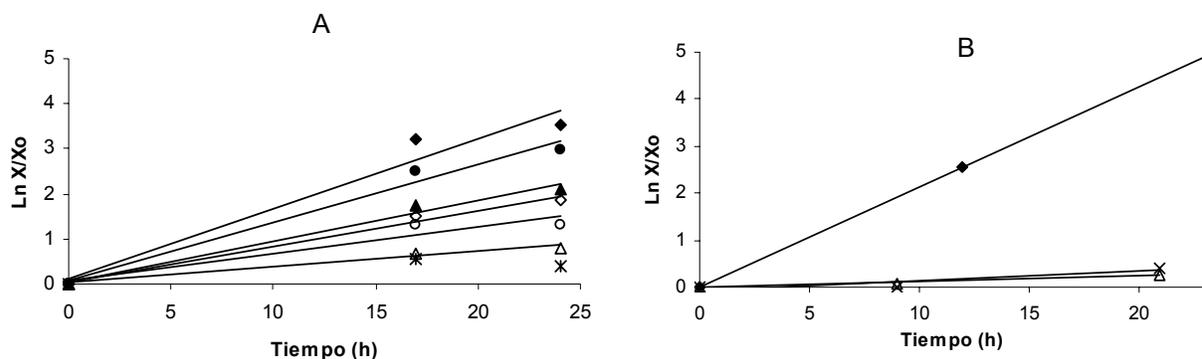
La degradación de LAS se midió al inicio y 32 horas después de la inoculación. Las velocidades específicas se calcularon con base en el valor de la biomasa obtenida en cada corrida experimental.



**Figura 5.3** Cinética de crecimiento de la cepa M113 bajo condiciones aerobias empleando LAS como fuente de carbono (35°C LAS:NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = 1:1, 200 RPM), (◆ control glucosa 400 mg·L<sup>-1</sup>, ■ LAS 200 mg·L<sup>-1</sup> y ● LAS 400 mg·L<sup>-1</sup>).

Al graficar los valores calculados de la velocidad específica de crecimiento  $\mu$  ( $= 1/t \cdot \ln(X/X_0)$ ), en función de la concentración del surfactante LAS (Figura 5.4), se observó que el surfactante inhibió la velocidad de crecimiento de la cepa M113 a una dosis letal media (LD<sub>50</sub>) de 105 mg·L<sup>-1</sup> bajo condiciones desnitrificantes. Dado que en aerobiosis se probaron dos concentraciones (200 y 400 mg·L<sup>-1</sup>) de surfactante para evaluar su efecto en la morfología de la célula, los valores de la LD<sub>50</sub> no fueron determinados.

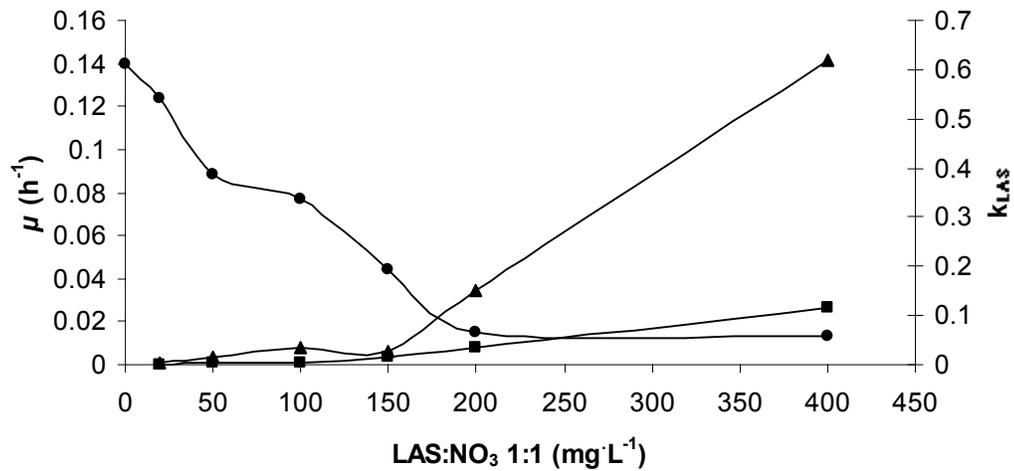
Mientras que en los medios (bajo condiciones aerobias y desnitrificantes) con glucosa se obtuvo una buena velocidad de crecimiento y alta producción de biomasa, en los medios adicionados con LAS se observó una limitación en el crecimiento del cultivo debido a la presencia del surfactante.



**Figura 5.4** Determinación del coeficiente específico de crecimiento de *P. aeruginosa* M113 bajo condiciones anóxicas (A) y aerobias (B) en diferentes concentraciones de surfactante LAS: ◆ control glucosa, ● LAS 20 mg·L<sup>-1</sup>, ▲ LAS 50 mg·L<sup>-1</sup>, ◇ LAS 100 mg·L<sup>-1</sup>, ○ LAS 150 mg·L<sup>-1</sup>, △ LAS 200 mg·L<sup>-1</sup> y \* LAS 400 mg·L<sup>-1</sup> (35°C, LAS:NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = 1:1).

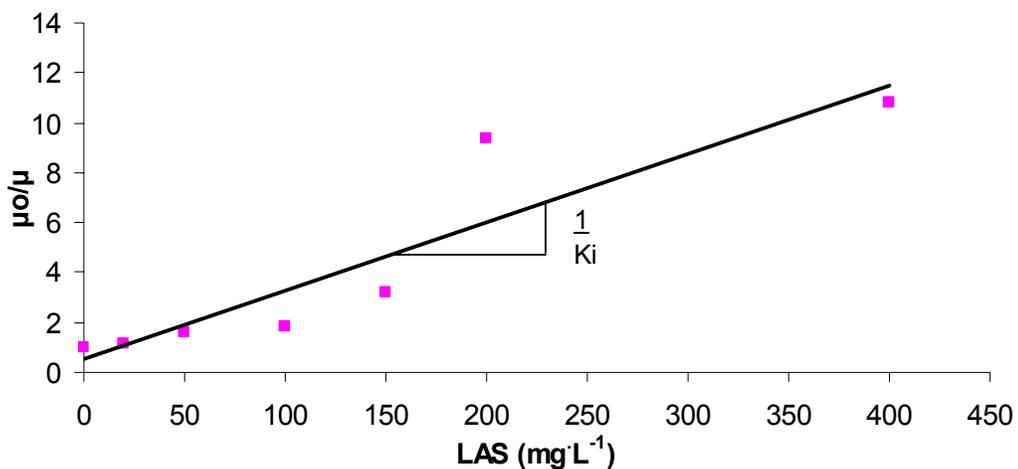
En condiciones anóxicas se observó que la velocidad específica de consumo del surfactante ( $k_{LAS}$ )  $\text{mg}_{LAS\text{degradado}} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{biomasa}}^{-1}$  aumentó conforme se incrementó la concentración de LAS (Figura 5.5). Mientras tanto, en condiciones aerobias, en las concentraciones de 200 y 400 mg·L<sup>-1</sup> de LAS, se observó que las  $K_{LAS}$  (0.019 y 0.021 para 200 y 400 mg·L<sup>-1</sup>, respectivamente) fueron menores a las obtenidas bajo condiciones anóxicas.

Al analizar el consumo de nitrato se evidenció que este se consume en su totalidad y con mayor rapidez que el LAS, con una velocidad específica de consumo de nitrato ( $K_{NO_3}$ ) de  $0.7 \text{ mg}_{NO_3\text{consumido}} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{biomasa}}^{-1}$  para la concentración de LAS:NO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 400 mg·L<sup>-1</sup>, la cual resultó ser 6 veces más grande que la  $K_{LAS}$  (Figura 5.5). Posiblemente se requiere el uso de una mayor concentración de nitrato para lograr que el LAS se degrade por completo bajo estas condiciones.



**Figura 5.5** Coeficiente específico de crecimiento (●), velocidad específica de degradación de LAS  $K_{LAS}$  (■) y velocidad específica de consumo de  $NO_3^-$ :  $K_{NO_3^-}$  (▲) por *Pseudomonas aeruginosa* M113 bajo condiciones anóxicas.

Por analogía con la ecuación de cinética enzimática,  $\mu = \mu_o / (1 + (I/K_i))$ , fue posible determinar el valor de la constante de inhibición ( $K_i$ ) del surfactante hacia la cepa M113 bajo condiciones anóxicas, la cual fue de  $36 \text{ mg}_{LAS} \cdot \text{L}^{-1}$ , (Figura 5.6).



**Figura 5.6** Constante de inhibición de la cepa M113 en condiciones anóxicas

$$\left( \frac{\mu_o}{\mu} = 0.0275I + 0.5042 \right) K_i = \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}.$$

Es importante notar que al aumentar la concentración de LAS en condiciones anóxicas, el coeficiente específico de degradación de LAS ( $K_{LAS}$ ) de la cepa M113 aumenta, así como también este es superior al valor obtenido mediante condiciones aerobias, en las concentraciones de 200 y 400 mg·L<sup>-1</sup>. De igual forma, el coeficiente específico de crecimiento ( $\mu$ ) obtenido en condiciones aerobias fue menor al obtenido mediante desnitrificación, lo cual puede estar relacionado con la agitación necesaria que ocasionó que la cepa redujera su biomasa y presentara un  $\mu$  menor que en condiciones anóxicas (Figura 5.5).

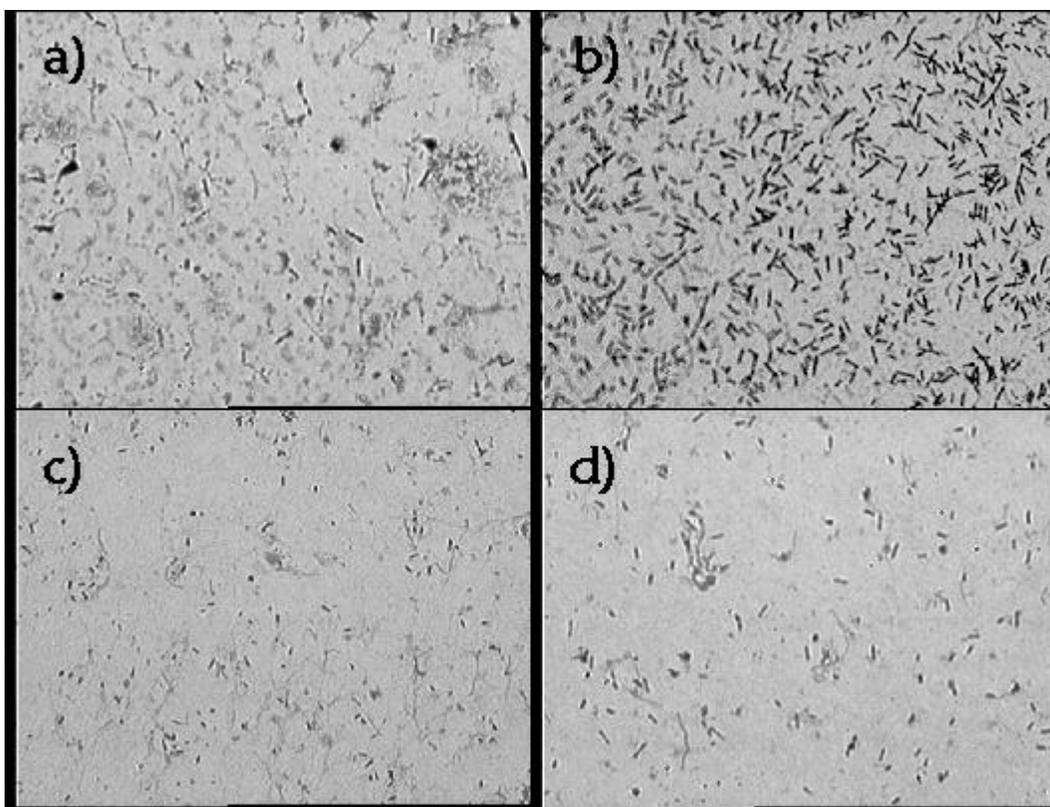
Se ha reportado que la cepa M113 no puede utilizar lactosa como fuente de carbono (sustrato que se empleó en la degradación en continuo de LAS) tanto en condiciones aerobias como anóxicas (Soberón *et al.* 1996), además de que produce un exopolímero que le ayuda a adherirse a los gránulos del reactor, incrementando la posibilidad de una incorporación exitosa de la bacteria en los lodos del RA (García *et al.* 1998). Tomando en cuenta lo anterior, la posibilidad de que la bacteria colonice los lodos del reactor acidogénico se ve favorecida, lo cual ayudaría en la degradación del LAS como fuente de carbono.

## **5.2 Efecto de LAS en la morfología de *Pseudomonas aeruginosa* M113.**

Al cultivar la cepa M113 en 200 y 400 mg·L<sup>-1</sup> de LAS, las tinciones de Gram realizadas a lo largo de la cinética revelaron que el bacilo desarrolló cambios morfológicos en cuanto al tamaño celular. Estos cambios se presentaron tanto en condiciones aerobias como anóxicas, a partir de las 21 horas de inoculada la cepa (Tabla 5.1, Figura 5.7). Asimismo, preparaciones en fresco de las mismas muestras indicaron que a pesar de la reducción en el tamaño, la bacteria M113 presentó movilidad, lo cual indica su viabilidad en medio con LAS.

**Tabla 5.1** Longitudes de la célula de *P. aeruginosa* M113 inoculada con el medio LAS y sin LAS a las 32 horas

Tratamiento	Longitud $\mu\text{m}$
Tiempo cero	$1.8 \pm 0.61$
Control anóxico glucosa	$1.817 \pm 0.25$
Anóxico $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LAS	$0.88 \pm 0.14$
Anóxico $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LAS	$1.174 \pm 0.29$
Control aerobio glucosa	$1.833 \pm 0.4$
Aerobio $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LAS	$0.953 \pm 0.19$
Aerobio $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LAS	$0.864 \pm 0.12$



**Figura 5.7** Observación de *Pseudomonas aeruginosa* cepa M113 bajo el microscopio óptico (100 X): A) tiempo cero, B) control aerobio 32 horas, C)  $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de LAS condiciones aerobias y D)  $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  en condiciones anóxicas.

La longitud de la célula de la cepa M113 se redujo aproximadamente en un 50% a partir de las 21 horas tanto en condiciones aerobias como anóxicas (Figuras 5.3c y d). Lo anterior probablemente se debió a la misma protección en contra del surfactante o bien, a daños sufridos en la membrana celular.

## 5.3 Medio específico para la cepa M113.

Con la finalidad de prevenir falsos positivos en las cuentas celulares una vez que la cepa M113 fuera inoculada en el reactor, se realizaron pruebas de crecimiento de esta bacteria con el medio selectivo (ver anexos). En la tabla 5.2 se observa la especificidad del medio empleado para contar las colonias de la cepa M113, en dónde se muestra que no se encontraron bacterias que fueran capaces de desarrollarse en este medio. Por el contrario, la cepa M113 presentó un crecimiento con colonias pequeñas y redondas.

**Tabla 5.2** Pruebas de efectividad del medio selectivo antes de inocular la M113 en el reactor acidogénico.

	<b>Crecimiento</b>
Lodo acidogénico	-
Lodo metanogénico	-
Cepa M113	+

## 5.4 Estudios de degradación en continuo.

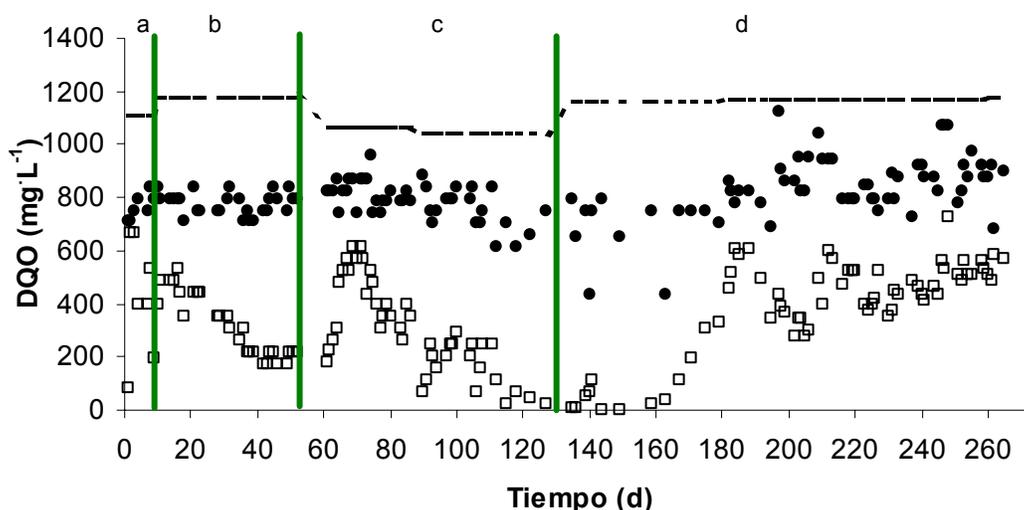
### 5.4.1 Inoculación del reactor con *Pseudomonas aeruginosa*

**M113.** La cepa M113 se inoculó en el reactor acidogénico, conectando un matraz

con 2 L de medio de cultivo con una concentración de  $3.2 \times 10^{10}$  UFC·mL<sup>-1</sup>. El contenido del matraz se recirculó en el reactor durante 5 días a fin de colonizarlo con la cepa, hasta llegar a una concentración de  $2.4 \times 10^8$  UFC·mL<sup>-1</sup>.

### 5.4.2 Degradación del alquilbencen sulfonato de sodio y

**de lactosa.** La eficiencia de remoción en el reactor acidogénico (RA) no se afectó por la presencia del LAS (Figura 5.8), permaneciendo en un 30% a través del experimento. En el periodo c, en dónde no se alimentó con LAS, y al principio del periodo d se obtuvo la máxima remoción, la cual fue de un 40%.

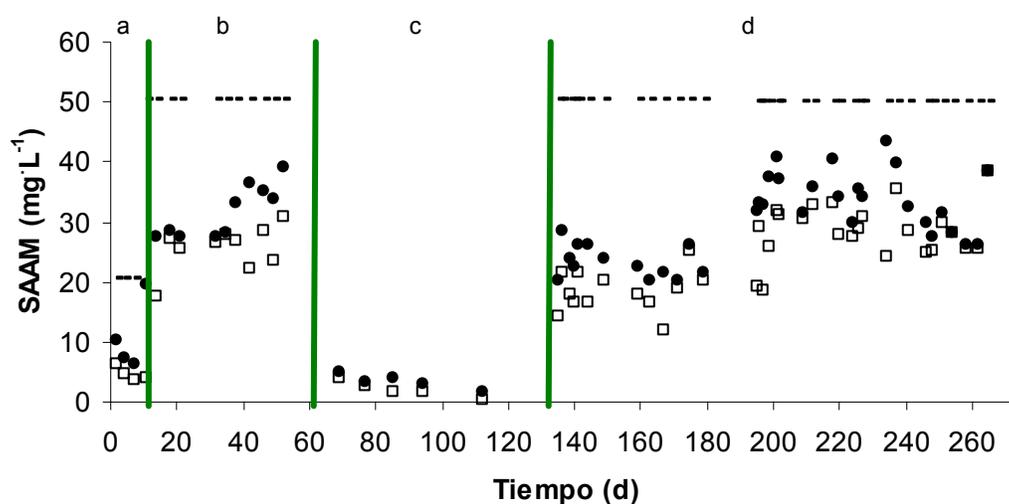


**Figura 5.8.** Remoción de la materia orgánica a)  $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  LAS; b) y d)  $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  LAS y c) no LAS (--alimentación, ● efluente RA y □ efluente RM).

Las velocidades de consumo de la materia orgánica ( $\text{mgDQO}_{\text{removido}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), así como de la pérdida de consumo de la materia orgánica ( $\text{mgDQO}_{\text{noremovido}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), se determinaron a partir de las pendientes observadas durante los periodos b, c y d.

El reactor metanogénico (RM) se afectó por la presencia del LAS residual proveniente del RA. En la figura 5.8 se muestra que durante el periodo b, después de incrementar la alimentación inicial de 20 mg·L<sup>-1</sup> a 50 mg·L<sup>-1</sup> de LAS, se observa un mejoramiento en la eficiencia de remoción hasta alcanzar 75% con una velocidad de consumo de materia orgánica de 13.26 mgDQO<sub>removido</sub>·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>. Asimismo, durante el periodo en dónde no se alimentó con LAS (c) se logró una eficiencia de remoción del 95% cuando la concentración de LAS en la salida fue despreciable (figura 5.9), con una velocidad de consumo de la DQO de 8.91 mgDQO<sub>removido</sub>·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>.

Cuando el LAS se volvió a adicionar, la eficiencia de remoción del RM fue superior al 90% durante 23 días para después caer hasta un 23 %, observándose que la velocidad de la pérdida de degradación de DQO es más rápida que la velocidad de consumo, la cual fue de -22.36 mgDQO<sub>noremovido</sub>·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>.

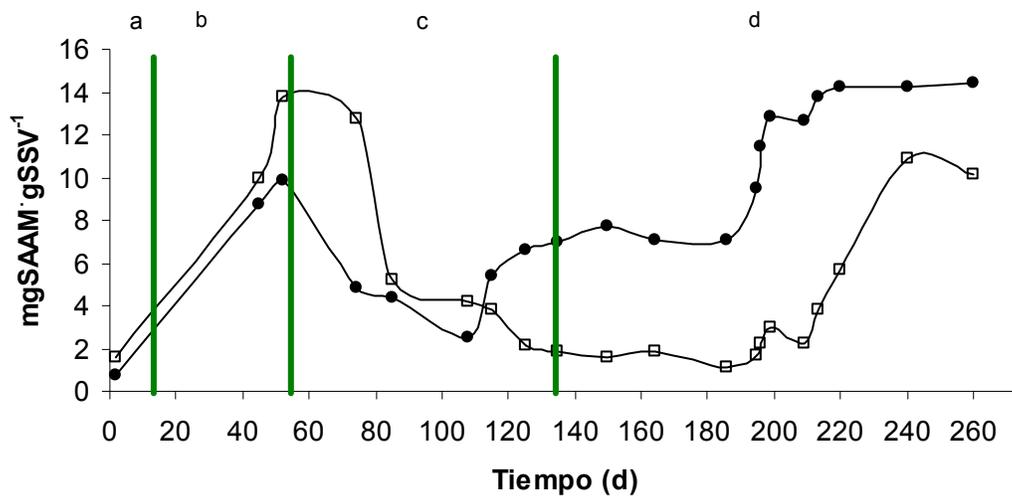


**Figura 5.9.** LAS como sustancia activa al azul de metileno (SAAM) a) 20 mg·L<sup>-1</sup> LAS; b) y d) 50 mg·L<sup>-1</sup> LAS c) Sin LAS (--alimentación; ● efluente RA y □ efluente RM).

El LAS se degradó solo en el reactor acidogénico (Figura 5.9) aunque parte del surfactante de entrada se adsorbió a los lodos de los reactores, ya que es altamente adsorbido por los gránulos y algunas veces puede representar hasta un 60% de la cantidad total (González- Mazo *et al.*, 1998). Al incrementar la concentración de 20 a 50 mg·L<sup>-1</sup>, el surfactante se acumuló en 9 y 14 mg<sub>SAAM</sub>·g<sub>SSV</sub><sup>-1</sup> en los lechos de los reactores acidogénico y metanogénico, respectivamente (Figura 5.10).

Asimismo, al adsorberse el surfactante, la eficiencia de remoción de LAS del reactor acidogénico disminuyó hasta un 33% (Figura 5.9b).

Cuando el reactor acidogénico no se alimentó con LAS, el surfactante adsorbido fue liberado del lecho (figura 5.10c). Al volver a alimentar con el surfactante, su acumulación se incrementó de nuevo hasta que la actividad en el RM fue nula. Esto sucedió a concentraciones de 14 y 10 mg<sub>SAAM</sub>·g<sub>SSV</sub><sup>-1</sup> (figura 5.10d) para los reactores acidogénico y metanogénico, respectivamente.



**Figura 5.10** LAS adsorbido en los lodos acidogénicos (-●-) y metanogénicos (-□-).

La acumulación de LAS ocasionó una pérdida de biomasa en ambos reactores. En la Tabla 5.3 se muestran las características de los lodos de ambos reactores al inicio del experimento y después de 150 días.

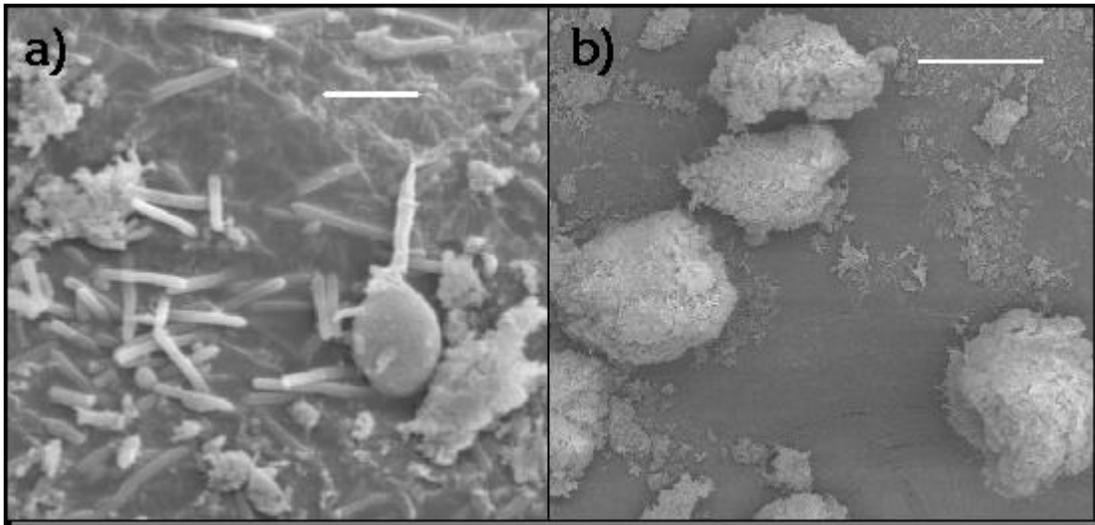
En lo que respecta al reactor acidogénico, en la misma tabla se observa que a medida que transcurrió el tiempo de alimentación con LAS, se observó la formación de un mucílago viscoso de color blanco amarillento que envolvió a los lodos, haciendo que éstos se esponjaran y por tanto, que algunos sólidos del reactor se lavaran. Parte de este mucílago emigró al RM.

**Tabla 5.3** Composición de los lodos acidogénicos y metanogénicos durante el experimento en continuo.

	RA		RM	
	t = 0 d	t =150 d	t =0 d	t = 150 d
Sólidos Totales (g·L <sup>-1</sup> )	44.58	20	22.08	18
Sólidos Fijos (g·L <sup>-1</sup> )	26.96	8.0	10.02	7.4
Sólidos Volátiles (g·L <sup>-1</sup> )	17.62	12	12.06	10.5
Sólidos Volátiles Totales (g)	1.31	1.6	3.83	4.2
Volumen de Lodos (L)	0.074	0.137	0.32	0.39
Volumen de Reactor (L)	0.34		1.35	

El aumento del volumen de lodos y la pérdida de la concentración en sólidos volátiles, llegando hasta un 22.1% en el reactor acidogénico y de un 9.7 % para el metanogénico, indica un proceso de pérdida de floculación o de granulación que al descompactarse deja escapar sólidos.

En la figura 5.11 se observa la manera en que las bacterias (bacilos cortos) del RA se encontraron inmersas en el mucílago, así como también las dimensiones de los gránulos (alrededor de 60  $\mu\text{m}$  de diámetro).



**Figura 5.11.** Micrografías de barrido del lodo acidogénico en el día 50, alimentado con LAS 50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . A) 3000 X, 10 Kv, longitud de la barra 5  $\mu\text{m}$ ; B) 500 X, 10 Kv, longitud de la barra 40  $\mu\text{m}$ .

Tomando en cuenta los periodos pseudoestacionarios de las tres etapas de alimentación con LAS, se calculó la velocidad de consumo de LAS en el reactor acidogénico mediante la utilización del siguiente balance:

$$\frac{dL}{dt} = D(L_0 - L) - X \left( \frac{\mu}{Y} - k' \cdot K \right) = 0 \quad (1)$$

en dónde:  $dL/dt$  = velocidad de consumo de LAS  $mgLAS \cdot d^{-1}$

$D = F/V$  tasa de dilución del reactor =  $d^{-1}$

$(L_0-L)$  = LAS total de entrada y salida del sistema =  $mgLAS \cdot L^{-1}$ .

$X$  = biomasa en el reactor =  $gSSV \cdot L^{-1}$

$\mu/Y$  = El LAS que se degrada =  $mgLAS \cdot gSSV^{-1} \cdot d^{-1}$

$k'$  = constante de adsorción de LAS en la biomasa =  $d^{-1}$

$K$  = LAS adsorbido en los lodos =  $mgLAS_{adsorbido} \cdot gSSV^{-1}$

Arreglando el balance de la ecuación 1 para los estados pseudoestacionarios:

$$\frac{\Delta L}{\Delta t} = \frac{L_t - L_{t-1}}{\Delta t} = D(L_{0t} - L_t) - X \left( \frac{\mu}{Y} + k'(K_t - K_{t-1}) \right) = 0 \quad (2)$$

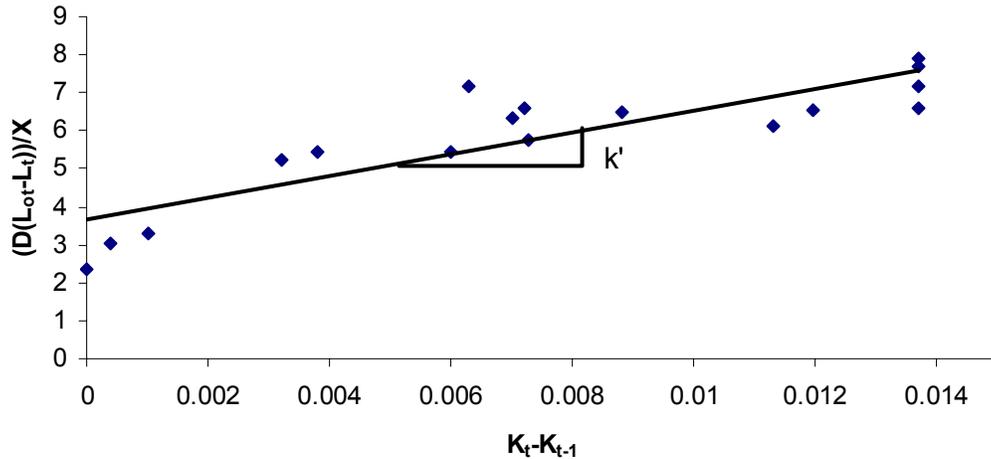
Linearizando la ecuación 2 obtenemos

$$\frac{D(L_{0t} - L_t)}{X} = \frac{\mu}{Y} + k'(K_t - K_{t-1}) \quad (3)$$

la cual explica la velocidad de consumo específica de LAS ( $\mu/Y = mgLAS_{degradado} \cdot gSSV^{-1} \cdot d^{-1}$ ) en el reactor acidogénico en función del LAS adsorbido en los lodos, así como la velocidad específica de adsorción ( $k' \cdot K = mgLAS_{adsorbido} \cdot gSSV^{-1} \cdot d^{-1}$ ). La velocidad de adsorción del LAS es mayor a la velocidad de degradación, por lo cual se puede esperar que el surfactante se acumule en los lodos (figura 5.12). También se puede apreciar que el valor de  $K_{LAS}$  es mucho mayor al que presentó la bacteria M113 en lote.

Por otro lado, para obtener la cantidad de LAS que se libera y la cantidad que se consume durante el periodo en que no se alimentó con LAS, se utilizó el siguiente balance:

$$\frac{dL}{dt} = \frac{L_t - L_{t-1}}{\Delta t} = -DL - \frac{\mu}{Y}X - k' \cdot X \cdot (K_t - K_{t-1}) \quad (4)$$



**Figura 5.12.** Velocidad específica de consumo de LAS durante las etapas pseudoestacionarias en el reactor acidogénico ( $k' \cdot K = 3.91 \text{ mgLAS}_{\text{adsorbido}} \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ;  $\mu/\gamma = 3.65 \text{ mgLAS}_{\text{degradado}} \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ).

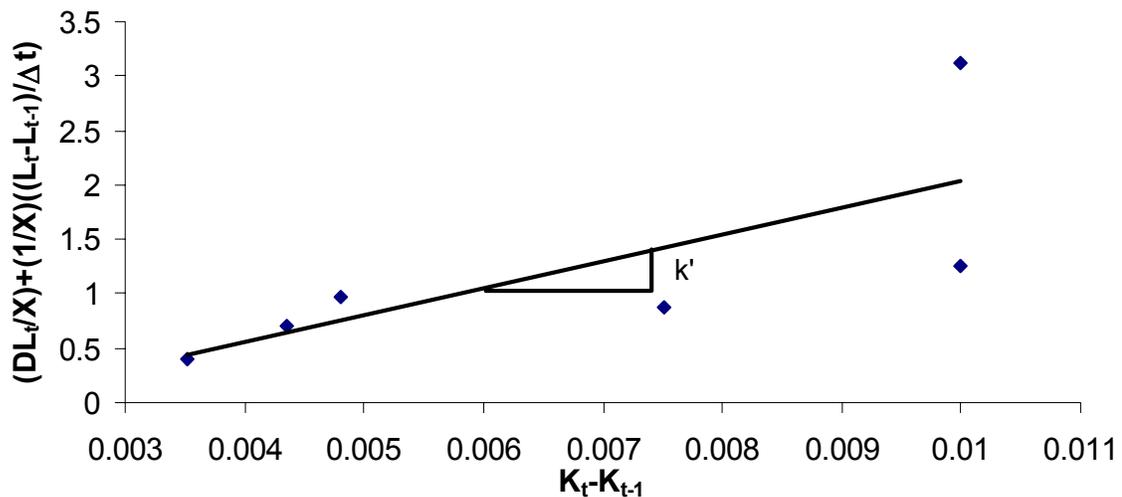
Arreglando la ecuación 4 tenemos:

$$\frac{L_t - L_{t-1}}{\Delta t \cdot X} + \frac{DL_t}{X} = -\frac{\mu}{Y} - (K_t - K_{t-1})k' \quad (5)$$

Linearizando esta ecuación se observa la siguiente expresión

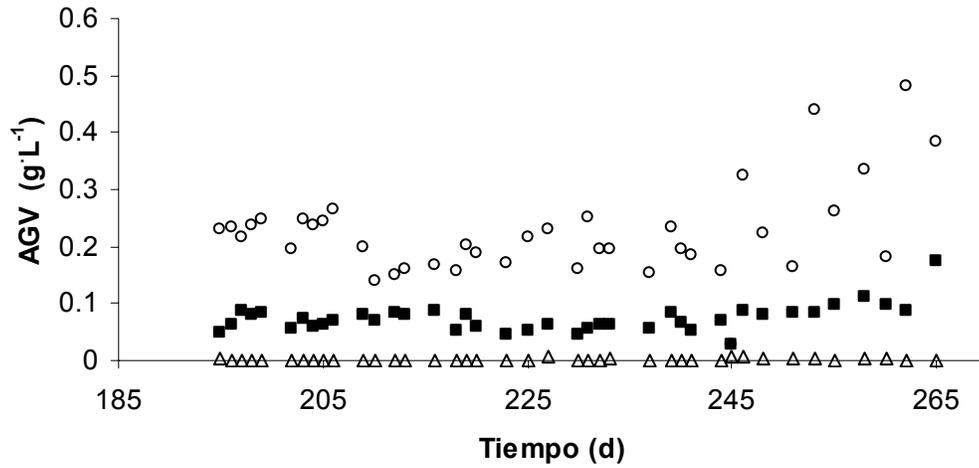
$$\frac{DL_t}{X} + \frac{1}{X} \left( \frac{L_t - L_{t-1}}{\Delta t} \right) = -\frac{\mu}{Y} - (K_t - K_{t-1}) \cdot k' \quad (6)$$

En la figura 5.13 se muestra la velocidades específicas de consumo y de desorción ( $k' \cdot K = \text{mgLAS}_{\text{desorbido}} \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) del surfactante en función del LAS adsorbido en los gránulos. A pesar de que el LAS se libera de los lodos, una parte es degradado. La velocidad específica de adsorción es mayor que la de desorción lo cual corrobora la acumulación de LAS en los lodos.

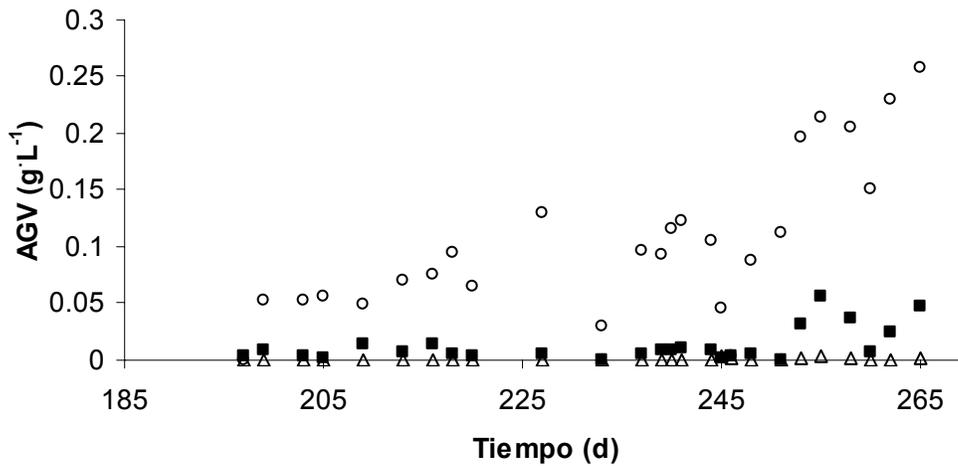


**Figura 5.13** Desorción y consumo de LAS en el reactor acidogénico durante la etapa de lavado ( $k' \cdot K = 2.47 \text{mgLAS}_{\text{desorbido}} \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ;  $\mu/y = 0.4362 \text{mgLAS} \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ).

Al acumularse el LAS en los lodos (Figura 5.10d), los reactores acidogénico (figura 5.14) y metanogénico (figura 5.15) produjeron más ácidos grasos volátiles, alcanzando 81 y 50% del DQO total en los efluentes, respectivamente. Esto sugiere que las bacterias acidogénicas no se afectan por el LAS, mientras que las metanogénicas se vieron inhibidas. Estos datos concuerdan con los reportados por Wagener y Schink (1987) en donde a una concentración de LAS de  $0.69 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  en un reactor de cama fija (1000 mL) se encontró que el acetato se produjo en mayor concentración ( $0.18 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), cuando la metanogénesis se inhibió.

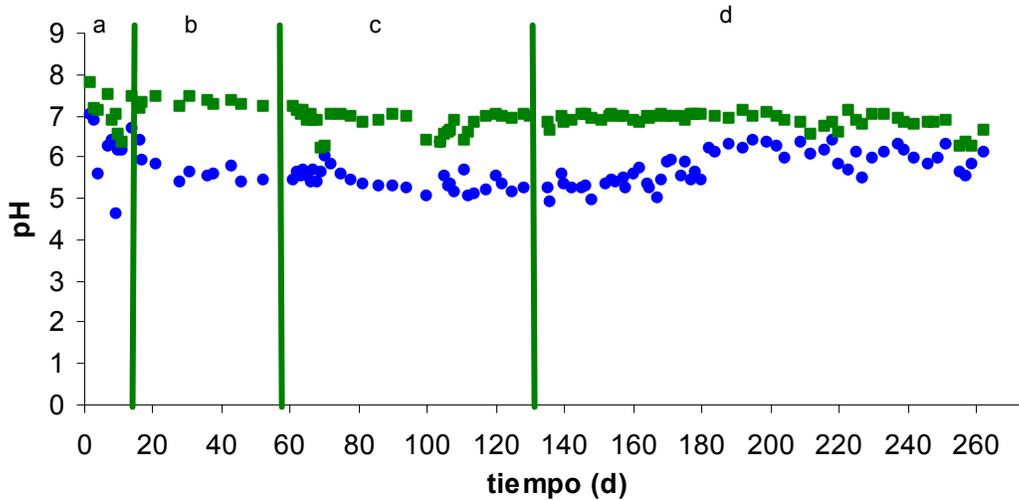


**Figura 5.14** AGV en el efluente del RA durante el periodo de cuando el LAS se acumuló en los lodos en  $14 \text{ mg gSSV}^{-1}$ . (○ acetato, ■ propionato y Δ butirato).



**Figura 5.15** AGV en el efluente del RM durante el periodo d, cuando el LAS se alimentó de nuevo y fue adsorbido en los lodos en  $10 \text{ mg gSSV}^{-1}$ . (○ acetato, ■ propionato y Δ butirato).

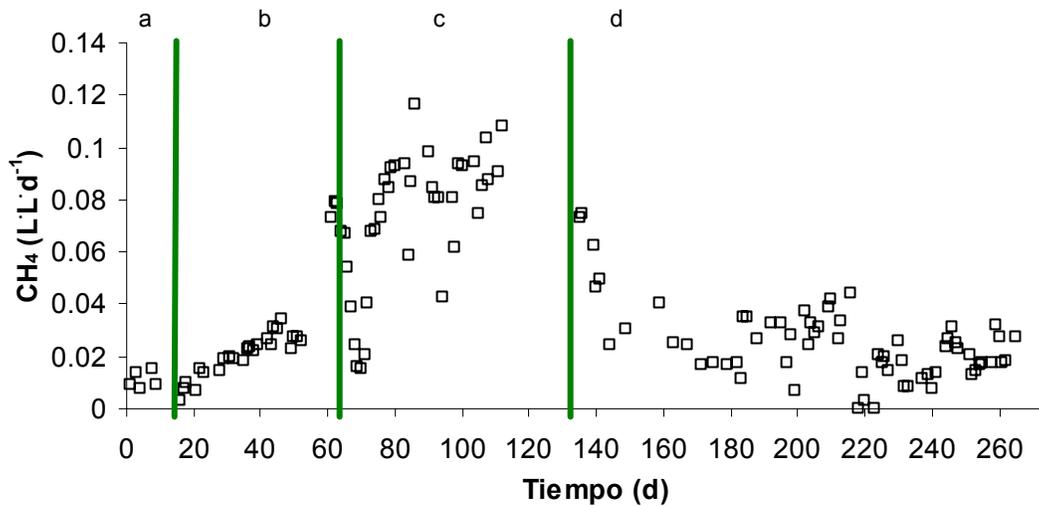
El valor de pH del RA permaneció en un rango de 5.2 a 6.2 mientras que en el RM fluctuó en un rango de 6.6 a 7 (Figura 5.16).



**Figura 5.16.** Evolución del valor de pH en el sistema de dos etapas (● reactor acidogénico y ■ reactor metanogénico).

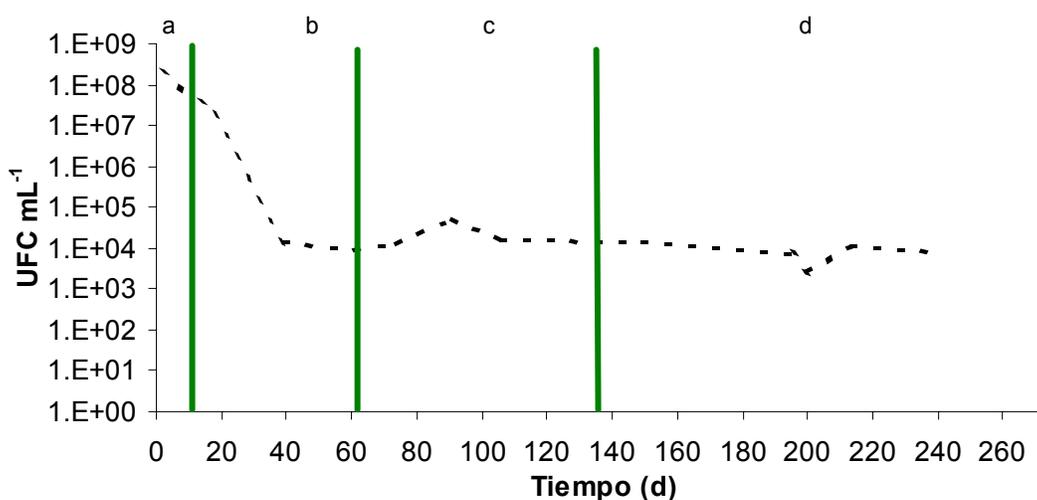
Antes de añadir LAS a los reactores RA y RM, estos fueron alimentados con  $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de lactosa durante 25 días en paralelo, observándose que en el RA el biogás producido consistió en su mayoría de  $\text{CO}_2$ . En cuanto al RM, la producción de metano fue de  $0.09\text{ L}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  de  $\text{CH}_4$ , mientras que el valor teórico esperado fue de  $0.15\text{ L}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  de  $\text{CH}_4$ .

Al alimentar el RA con el LAS y conectar el reactor RM en serie a la salida del RA, la producción de metano se paró casi por completo aunque se recuperó lentamente hasta que el LAS se acumuló en los lodos al final del periodo b; después disminuyó al inicio del periodo c, en dónde no se alimentó con LAS. Esto posiblemente se debió al LAS acumulado en los lodos, ya que la producción de metano (Figura 5.17) se recuperó al liberarse el surfactante de los gránulos (figura 5.10 c).



**Figura 5.17** Producción de metano en el reactor metanogénico. a) 20 mg·L<sup>-1</sup> LAS ; b) y d) 50 mg·L<sup>-1</sup> LAS y c) Sin LAS.

La cuenta total de la cepa M113 comenzó a disminuir a partir del día 40, de un valor inicial de 10<sup>8</sup> UFC·mL<sup>-1</sup> a 10<sup>4</sup> UFC·mL<sup>-1</sup> de lodo hasta llegar a 10<sup>3</sup> al final del experimento (Figura 5.18). Al analizar la cuenta celular de la cepa M113 en los gránulos acidogénicos, se observó que esta se encontró en una baja proporción con respecto a las demás bacterias comúnmente presentes en lodos acidogénicos (tabla 5.4). Lo anterior hace suponer que la cepa también se localizaba en el medio líquido del reactor, lo cual es posible debido a su alta velocidad de crecimiento (Guiot *et. al.*, 1992).



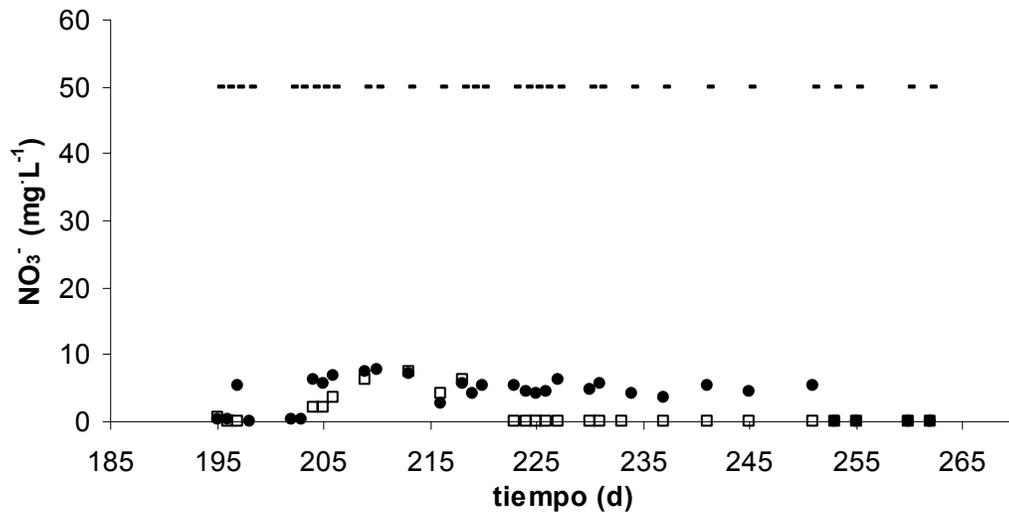
**Figura 5.18.** Permanencia de la cepa M113 en el lodo acidogénico.

**Tabla 5.4** Microbiología de un reactor acidogénico (Bv de 7.8 gDQO·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> Bx = 2..25 gDQO·gSSV<sup>-1</sup> pH 3.99) (Monroy 1998).

Grupo	NMP·gSSV <sup>-1</sup>	NMP·ml <sup>-1</sup> de gránulo
Fermentativas	9.44 × 10 <sup>9</sup>	8.24 × 10 <sup>11</sup>
OHPA		
Propiónico	1.68 × 10 <sup>2</sup>	1.4 × 10 <sup>4</sup>
Butírico	1.07 × 10 <sup>9</sup>	9.34 × 10 <sup>10</sup>
Metanogénicas		
Acetoclastas	1.34 × 10 <sup>7</sup>	1.17 × 10 <sup>9</sup>
Hidrogenotróficas	1.07 × 10 <sup>10</sup>	9.8 × 10 <sup>12</sup>

En cuanto al nitrato, el cual fue empleado como aceptor de electrones, éste fue consumido totalmente en el RA, lo cual concuerda con lo observado en la degradación en lote de LAS, en dónde la  $K_{NO_3}$  fue superior que la de  $K_{LAS}$ , por lo que es necesario

una mayor cantidad de  $\text{NO}_3^-$  para lograr la completa degradación de LAS en el reactor acidogénico (Figura 5.19).



**Figura 5.19.** Consumo de nitrato en el reactor acidogénico (●) y metanogénico (□) cuando el LAS se encontró en mayor cantidad adsorbido en los lodos (ver figura 5.10).

Al comparar los resultados obtenidos con los reportados por Terreros (1999) (Figura 1.4), tenemos que en ambos sistemas la degradación de LAS se llevó a cabo en el reactor acidogénico y al acumularse el detergente en los lodos se afectó la remoción de la materia orgánica. Asimismo, ambos sistemas recuperaron su eficiencia de remoción de la materia orgánica al momento de liberarse el LAS acumulado. En la tabla 5.5 se comparan los resultados globales de ambos sistemas, en dónde se observa que la bioaugmentación no mejoró la degradación del LAS.

**Tabla 5.5** Comparación entre reactores acidogénicos bioaumentado con *P. aeruginosa* cepa M113 y no bioaumentado.

	No bioaumentado	Bioaumentado
Carga orgánica (gDQO·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )	6	4.82
Carga de LAS (gLAS·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )	0.8	0.2
$\eta_{DQO}$ (%)	24	30
Remoción DQO (gDQO·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )	1.44	1.44
LAS (gLAS·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )	0.8	0.21
LAS removido (%)	53	41
Recuperación del reactor (d)	70	78
LAS alimentado (g)	49	12
LAS de salida(g)	23	7.14
Tiempo de alimentación (días)	160	175
LAS adsorbido (g)	0.05	0.035
LAS degradado (g)	26	4.86

## 6. CONCLUSIONES

Como se ha visto, varios estudios han demostrado que el surfactante alquilbencen sulfonato de sodio, LAS, no se degrada en condiciones anaerobias; mientras tanto, en condiciones aerobias, las aguas con grandes cantidades de surfactante ocasionan problemas de espumado. De ahí la necesidad de desarrollar una estrategia para lograr una mejor degradación del LAS en condiciones anaerobias. Por otro lado, dado que el surfactante LAS es un compuesto xenobiótico, los microorganismos de los lodos anaerobios principalmente las bacterias metanogénicas, tienen problemas a nivel de membrana debido a la composición de la pared celular. Para poder degradar este compuesto es necesario el empleo de microorganismos que posean una mayor capacidad de degradación.

La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* M113 puede degradar LAS bajo condiciones aerobias, por lo que se realizaron estudios en lote en condiciones anóxicas para observar su comportamiento. Al respecto se concluyó que los cambios morfológicos ocasionados por la presencia del surfactante dieron como resultado que la cepa M113 no fuera capaz de degradar el surfactante.

Dado que la cepa M113 se inhibió a concentraciones menores que  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , el sistema de degradación en dos etapas se alimentó a concentraciones de 20 a  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de LAS, encontrando que la degradación del surfactante solo se dió en la primera etapa debido a que las bacterias acidogénicas no se inhibieron por la presencia del mismo. Se

observó también una adsorción del surfactante en los lodos, el cual se liberó una vez que se dejó de alimentar con LAS.

Asimismo, la metanogénesis acetoclástica se inhibió por la acumulación del surfactante, disminuyendo considerablemente la producción de metano en presencia de LAS y recuperándose sin la presencia de éste.

En lo que respecta a la cepa M113, ésta permaneció en el reactor acidogénico en una cuenta celular baja, por lo que su presencia no ayudó de manera adecuada en la remoción del surfactante. Con base a lo anterior, es necesario entender mejor las relaciones que ocurren entre la cepa M113 y el conglomerado acidogénico, para así lograr la degradación del surfactante en condiciones anaerobias.

Por último, la digestión anaerobia en dos etapas es un buen sistema para efluentes con altas concentraciones de surfactante LAS, ya que el reactor acidogénico es más resistente a la presencia de éste. En cambio, un reactor metanogénico puede ser dañado severamente y tarda más tiempo en recuperarse.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- APHA. (1989). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 17th ed. Washington, DC. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation.
- Barber, L. B. II., Krueger, C., Metge, D. W., Harvey, R. W. y Field, J. A. (1995). Fate of linear alkylbenzene sulfonate in groundwater. Surfactant-Enhanced Subsurface Remediation: Emerging Technologies. Reprinted from ACS Symposium Series No. 594
- Bidlingmeyer, B.A. (1992). Practical HPLC Methodology and Applications. JOHN WILEY & SONS INC. USA.
- Brock, T.D. y Madigan, M.T. (1991). Microbiología. Sexta edición. Ed. PRENTICE - HALL HISPANOAMERICANA S. A. México. 681-685.
- Clarke, P.H. y Richmond M.H. (1975). Genetics and Biochemistry of *Pseudomonas*. Ed Wiley. UK.
- Famá, G. (1998). Caracterización Ultraestructural de Gránulos Anaerobios de Reactores UASB Industriales Operados en Mesofilia. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.
- Fang, H.H.P. (1997). Microbial Distribution and Syntrophic Association in UASB Granules. 8th international conference on anaerobic digestion. 1, 83-90.
- Federle, T.W. y Schwab, B.S. (1992). Mineralization of Surfactants in Anaerobic Sediments of Laundromat Wastewater Pond. *Wat. Res.* 26, 123-127.

- Fytianos, K., Voudrias, E. y Mouratidou, Th. (1998) the sorption-desorption behavior of linear alkylbenzene sulfonate in marine sediments. *Chemosphere*. 36: 2067-2074
- García, R.O. (1997). Degradación Anaerobia de Alquilbencen Sulfonato de Sodio Lineal (LAS) por una Cepa Mutada de *Pseudomonas aeruginosa* (M113). Memorias, VII Congreso Nal. de Biotecnología y Bioingeniería y II Simposio Int. Sobre Ing. De Bioprocesos. Pag. 266.
- García, R.O., Terreros, J., Monroy, O. y Soberón, G. (1998). Bioaumentación 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.
- González-Mazo, E., Forja, J.M. y Gómez-Parra, A. (1998). Fate and Distribution of Linear Alkylbenzene Sulfonates in the Littoral Environment. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1636-1641.
- Grotenhuis, J.T.C., Kissel, J.C., Plugge, C.M., Stams, A.J.M. y Zehnder, A.J.B. (1991). Role of Substrate Concentration in Particle Size Distribution of Methanogenic Granular Sludge in UASB Reactor. *Wat. Res.* 25, 21-27.
- Guiot, S.R., Paus, A. y Costerton, J.W. (1992). A Structured Model of Anaerobic Granule Consortium. *Wat. Sci. Tech.* 25, (7) 1-10.
- Guyot, J.P. (1990). Introducción a la Microbiología de los Digestores Anaerobios. *Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales en América Latina*. Ciudad Universitaria, México D. F., 8 y 9 de noviembre. Pag. 83-95.
- Hršak, D. (1996). Cometabolic Transformation of Linear Alkylbenzene Sulphonates by Methanotrophs. *Wat Res.* 30, 3092-3098.
- Hollinger, A.J., Stams, A.J. y Zehnder, J.B. (1988). Anaerobic Degradation of Recalcitrant Compounds. In *5<sup>th</sup> International Symposium on Anaerobic Digestion*. IAWPRC 211-221 (Hall E. R. And Hobson P. Ed) Pergamon Press, Paris, France.

- Jimenez, L., Breen, A., Thomas, N., Federle, T.W. y Saylor, G.S. (1991). Mineralization of Linear Alkylbenzene Sulfonate by a Four-member Aerobic Bacterial Consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1566-1569.
- Jorand, F., Bodé-Bigne, F., Block, J.C. y Urbain, V. (1998). Hidrophobic/hidrophilic Properties of Activated Sludge Exopolymeric Substances. *Wat. Sci. Tech.* 37, (4-5) 307-315.
- Kimerle, R.A. y Swisher, R.D. (1977). Reduction of Aquatic Toxicity of Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) by Biodegradation. *Wat. Res.* 11, 31-37.
- Krueger, C.J., Radakovich, K.M., Swayer, T.E., Barber, LB., Smith, R.L. y Field, J.A. (1998). Biodegradation of the Surfactant Linear Alkylbenzene Sulfonate in Sewage-Contaminated Groundwater: A comparison of Column Experiments and Field Tracer Tests. *Environ. Sci. Technol.* 32, 3954-3961.
- Lettinga, G., Velsen, A.F.M., van de Bona, S.W., Zeeuw, W.De y Klapwijk, A. (1980). Use of the Upflow Sludge Blanket (USB) Reactor Concept for Biological Wastewater Treatment, Especially for Anaerobic Treatment. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 699-734.
- Lewis, M.A. y Hamm, B.G. (1986). Environmental Modification of Photosynthetic Response of Lake Plankton to Surfactants an Significance to a Laboratory-field Comparison. *Wat: Res.* 20, 1575-1582.
- Lewis, M.A. (1991). Chronic and Sublethal Toxicities of Surfactants to Freshwater and Marine Animals: a Review and Risk Assessment. *Wat. Res.* 25, 101-113.
- Lewis, M.A. (1992). The effects of Mixtures and other Environmental Modifying Factors on the Toxicities of Surfactants to Freshwater and Marine Life. *Wat. Res.* 26, 1013-1026.
- Lim, D. (1998). Microbiology. 2d edition. Ed. McGraw-Hill. USA. Pp. 720.

- Maurer, W., Cordon, T.C., Well, J.K., Nuñez-Ponzoa, M.V., Ault, W.C. y Stirton, A.J. (1965). The effect of tallow- based detergent on anaerobic digestion. *The Journal of the American Oil Chemist Society*. 189-192.
- 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. 113.
- Moreno, A., Ferrer, J., Bravo, J. Berna, J.L. y Cavalli L. (1998). Effect of the Alkyl Chain and Concentration of Linear Alkylbenzene Sulfonate on Biodegradation Kinetics. *Tenside surf. Det.* 5, 375-378.
- Morgan, J.W., Forster, C.F. y Evison, L. (1990). A Comparative Study of the Nature of Biopolymers Extracted from Anaerobic an Activated Sludges. *Wat. Res.* 24, (6) 743-750.
- Oliveira, R.A., Vazoller, R.F. y Foresti, E. (1997). Sludge Bed Characteristics of UASB Reactors Growth, Activity, Microbial Structure and Chemical Composition of Granules. *Proc. 8<sup>th</sup> international conf. On anaerobic digestion.* 2, 524-531.
- Pérez, A.B. (1994). Degradación anaerobia de surfactantes. Tesis de Maestría, Departamento de biotecnología, UAM-I. Pp. 81. México D. F.
- Pirt, S.J. (1985). Principles of Microbe and Cell Cultivation. Blackwell Scientific Publications. Pp 4. U. K.
- Porter, M.R. (1994). Handbook of Surfactants. Blakie Academic & Professional. UK.
- Prats, D., Ruiz, F., Vasquez, B. y Rodriguez-Pastor, M. (1997). Removal of Anionic and Nonionic Surfactants in a Wastewater Treatment Plant With Anaerobic Digestion. A comparative study. *Wat. Res.* 31, 1925-1930.
- Rosen, M.J. (1978). Surfactants and Interfacial Phenomena. Ed John Wiley & Sons. USA.

- Saval, S. y Noyola, A. (1992). Aportaciones de la Biotecnología al Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales. *Biotecnología*, 2, (5 - 6) 155-172.
- Saval, S. (1993). Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales. *V Congreso Nacional de Biotecnología*. 3, (5 - 6).
- Schmidt, J.E. y Ahring, B.K. (1996). Granular Sludge Formation in Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) Reactors. *Biotechnol. Bioeng.* JOHN WILEY & SONS INC. USA. 49, 229-246
- Shelton, D.R. y Tiedje, J.M. (1984). General Method for Determining Anaerobic Biodegradation Potential. *Appl. Environm. Microbiol.* 47, (4) 850-857.
- 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, 1308-1312.
- Soberón-Chávez, G., Campos, J., Haïdour, J., Ramos, J.L. y Ortigoza, J. (1996). Selection and Preliminary Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* strain Mineralizing Elected Isomers in a Branched-chain Dodecylbenzene sulphonate Mixture. *World journal of Microbiology & Biotechnology*. 12 367-372.
- Stanier, R., Palleroni, N.J. y Duodoroff, J. (1966). The Aerobic *Pseudomonas*. A Taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43.
- Stanley, D. (1986). Biochemistry of Aromatic Hydrocarbon Degradation in *Pseudomonas*. The Bacteria, Vol. X Capítulo 15. Academic Press.
- Swisher, R. D. (1981). The problem of Ultimate Biodegradability of Linear Alkylbenzene Sulfonates. An Extension. *Tenside Detergent*. 18, 57-63.
- Tabor, C.F. y Barber, L.B. (1996). Fate of Linear Alkylbenzene Sulfonate in the Mississippi River. *Environmental Science & Technology*. 30, 161-171.
- Terreros, J. (1999). Comentario personal. Preparación de Tesis de Maestría en Biotecnología. UAM-Iztapalapa.

- Veiga, M.C., Jain, M.K., Wu, W.M., Hollingsworth, R.I. y Zeikus, J.G. (1997). Composition and Role of Extra Cellular Polymers in Methanogenics Granules. *Applied and Environmental Microbiology*. 63, (2) 403-407.
- Viñas, M., Martínez, J., Baselli, B., y Galain, C. (1990). Separación de Etapas Acidogénicas y Metanogénicas: Un Ejemplo con Agua Residual de Fabricación de Pulpa Termomecánica. *Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales en América Latina*. Ciudad universitaria, México D. F., 8 y 9 noviembre. Pag. 201-214.
- Viñas, M. (1994). Criterios de Diseño y Escalado de Reactores Anaerobios. En: III Taller y seminario latinoamericano "tratamiento anaerobio de aguas residuales" Montevideo-Uruguay. Pag. 111-125.
- Wagener, S. y Schink, B. (1987). Anaerobic Degradation of Nonionic and Anionic Surfactants in Enrichment Cultures and Fixed-bed reactors. *Wat. Res.* 21, 615-623.
- Wilson, F.J. y Jarbas, J.R. (1989). Chemical Oxygen Demand (COD) Using Microwave Digestion. *Wat. Res.* 23, (8) 1069-1071.
- Wolf, W. y Feijtel, T. (1998). Terrestrial Risk Assessment for Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) in Sludge-amended Solids. *Chemosphere*. 36, 1319-1343.
- Zhang, X., Bishop, P.L. y Kupfarle, M.J. (1998). Measurement of Polysaccharides and Proteins in Biofilm Extracellular Polymers. *Wat. Sci. Tech.* 37, (4-5) 345-348.

## 8. ANEXOS

### 8.1 Medios de cultivo.

**8.1.1. Medio mineral RAAM.** El medio mineral RAAM se prepara a partir de las soluciones concentradas con los diferentes reactivos y se mezclan en la proporción que se indica en la tercera columna de la tabla 6.1.

**Tabla 8.1** Composición del Medio Mineral RAAM (Shelton y Tiedje, 1984).

Reactivo	Solución Madre (g·L <sup>-1</sup> )	mL <sub>Sm</sub> /L <sub>medio</sub>	Conc en el medio (mg·L <sup>-1</sup> )
Solución mineral 1		50	350.00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7		
Solución mineral 2		50	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5.4		270.00
NH <sub>4</sub> Cl	10.6		530.00
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.5		75.00
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2.0		100.00
Solución mineral 3		1	
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.50		0.50
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	0.50		0.05
ZnCl <sub>2</sub>	0.50		0.05
CuCl <sub>2</sub>	0.03		0.03
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.01		0.01
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.05		0.05
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.05		0.05
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0.05		0.05
Solución mineral 4		10	
FeCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2		20.00

**Solución mineral 2.** Disolver por separado el  $\text{CaCl}_2$  para evitar precipitaciones.

**Solución 3 de oligoelementos.** Se disuelven perfectamente en un vaso las dos primeras sales. En otro vaso se disuelven los reactivos restantes excepto el  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  que se disuelve en un recipiente por separado agregando 1 mL de HCl concentrado.

**Solución 4.** Disolver directamente en 1 mL de HCl concentrado, cuando queden algunos cristales sin disolver, agregar agua hasta aforar a un litro.

Finalmente se mezclan las cuatro soluciones y se afora a un litro con agua destilada.

**8.1.2. Medio Luria (LB).** Disolver los tres primeros compuestos de la tabla 6.2 en un matraz Erlen-Meyer de acuerdo a la cantidad que se quiera preparar, clarificar el medio en la flama del mechero y tapar con tapón de gasa de algodón, (botellas serológicas con septos, si se desean condiciones anaerobias). Esterilizar a 15 psi por 15 minutos. Cuando el medio se encuentre frío, agregar el cloramfenicol y  $\text{HgCl}_2$ .

**Tabla 8.2** Composición del Medio Luria.

Reactivo	Concentración
Peptona de caseína	10 g·L <sup>-1</sup>
Extracto de levadura	5 g·L <sup>-1</sup>
NaCl	10 g·L <sup>-1</sup>
Cloramfenicol	10µg·mL <sup>-1</sup>
HgCl <sub>2</sub>	5µg·mL <sup>-1</sup>

**8.1.3. Medio para determinar unidades formadoras de colonias(UFC).** Disolver la glucosa, el LAS y el agar bacteriológico junto con las dos soluciones RAAM en un litro de agua destilada (tabla 6.3), Clarificar la solución en

la flama del mechero y esterilizar a 15 psi por 15 minutos. El cloramfenicol y cloruro de mercurio se agregan ya que el medio este tibio y no se encuentre solidificado.

**Tabla 8.3** Composición del medio para determinar Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en lodos del reactor acidogénico.

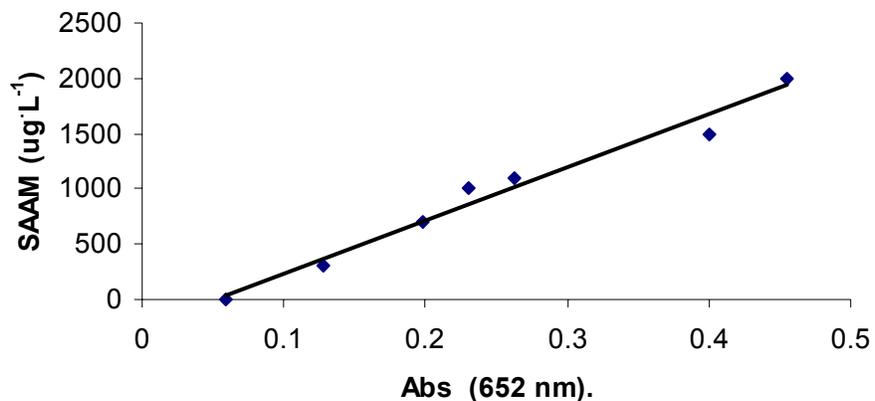
Reactivo	Concentración
Solución mineral 1	50 mL·L <sup>-1</sup>
Solución mineral 2	50 mL·L <sup>-1</sup>
Glucosa	0.7 g·L <sup>-1</sup>
LAS	0.3 g·L <sup>-1</sup>
Agar bacteriológico	15 g·L <sup>-1</sup>
Cloramfenicol	10 µg·mL <sup>-1</sup>
HgCl <sub>2</sub>	5 µg·mL <sup>-1</sup>

## 8.2 Curvas estándar.

### 8.2.1 Curva estándar de LAS.

**Tabla 8.4** Curva estándar de LAS como sustancias activas al azul de metileno (SAAM).

Abs (652 nm)	µ·L <sup>-1</sup>
0.059	0
0.128	300
0.198	700
0.23	1000
0.263	1100
0.4	1500
0.455	2000

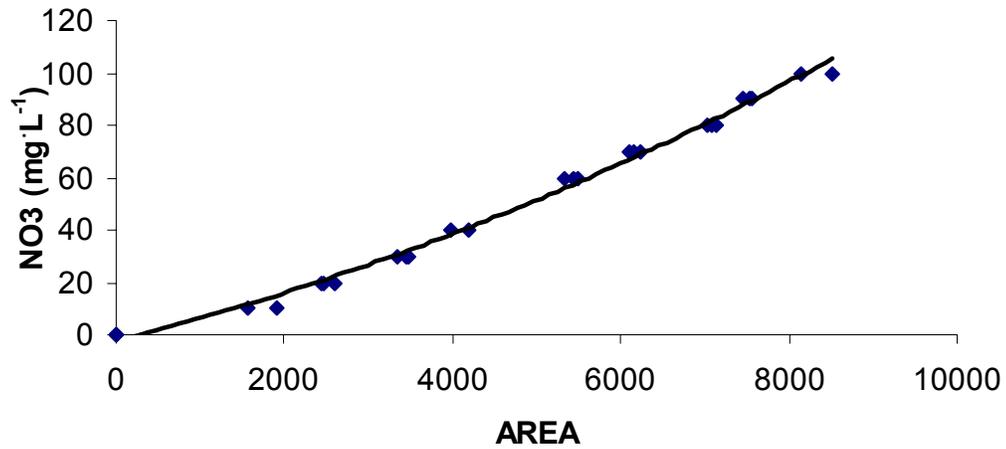


**Figura 8.1** Curva estándar de sustancias activas al azul de metileno (SAAM)  
(SAAM = 4804.6(Abs) - 246.62 R<sup>2</sup> = 0.9761).

## 8.2.2 Curva estándar de nitrato realizada por electroforesis capilar de iones.

**Tabla 8.5** Curva estándar de nitrato.

Área	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg·L <sup>-1</sup>	Área	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg·L <sup>-1</sup>	Área	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg·L <sup>-1</sup>
0	0	3355	30	6106	70
0	0	3459	30	7148	80
0	0	4204	40	7041	80
1899	10	3983	40	7091	80
1553	10	5486	60	7531	90
2588	20	5434	60	7459	90
2453	20	5343	60	7551	90
2454	20	6223	70	8517	100
3462	30	6144	70	8153	100

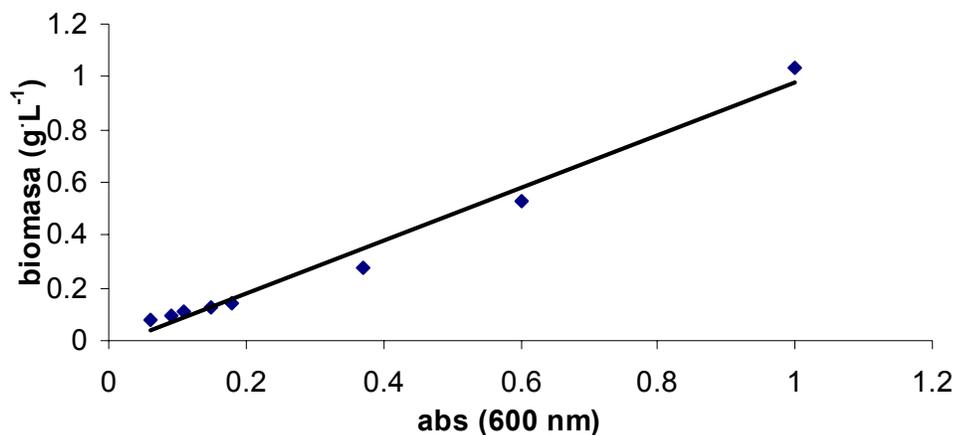


**Figura 6.2** Curva estándar del nitrato ( $\text{NO}_3^- = 5 \times 10^{-7} (\text{área})^2 + 0.008(\text{área}) - 2.0271$   
 $R^2 = 0.9947$ ).

### 8.2.3 Curva estándar de biomasa realizada por peso seco.

**Tabla 8.6** Curva estándar de biomasa.

Abs (600 nm)	SSV·L <sup>-1</sup>
1	1.037
0.6	0.526
0.37	0.274
0.18	0.14
0.15	0.13
0.11	0.109
0.09	0.091
0.06	0.08

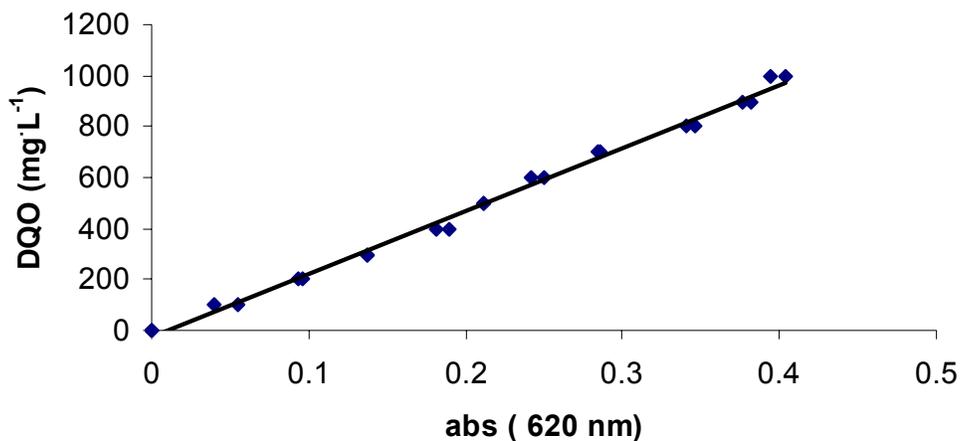


**Figura 8.3** Curva estándar de biomasa ( $X = 1.0045(\text{abs}) - 0.0231$   $R^2 = 0.9811$ ).

### 8.2.4 Curva estándar de la demanda química de oxígeno realizada por la técnica de reflujó cerrado modificada por Wilson *et al.* (1989).

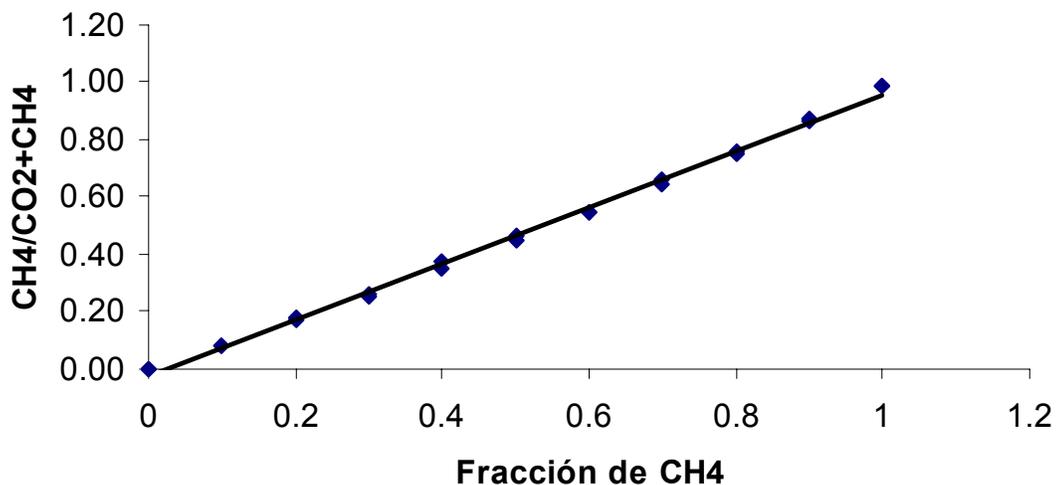
**Tabla 8.7** Curva estándar de la demanda química de oxígeno.

Abs. (620 nm)	DQO (mg·L <sup>-1</sup> )	Abs. (620 nm)	DQO (mg·L <sup>-1</sup> )
0	0	0.211	500
0	0	0.242	600
0.04	100	0.25	600
0.055	100	0.284	700
0.093	200	0.286	700
0.096	200	0.34	800
0.137	300	0.346	800
0.138	300	0.376	900
0.181	400	0.382	900
0.19	400	0.394	1000
0.211	500	0.404	1000



**Figura 8.4** Curva estándar de la demanda química de oxígeno (DQO). ( $DQO = 2474.5(\text{abs}) - 23.686$   $R^2 = 0.9947$ ).

### 8.2.5 Curva estándar de metano realizada por cromatografía de gases.



**Figura 8.5** Curva estándar de metano ( $\text{áreaCH}_4/\text{área total} = 0.9796(\gamma\text{CH}_4) - 0.0211$   $R^2 = 0.9976$ ).

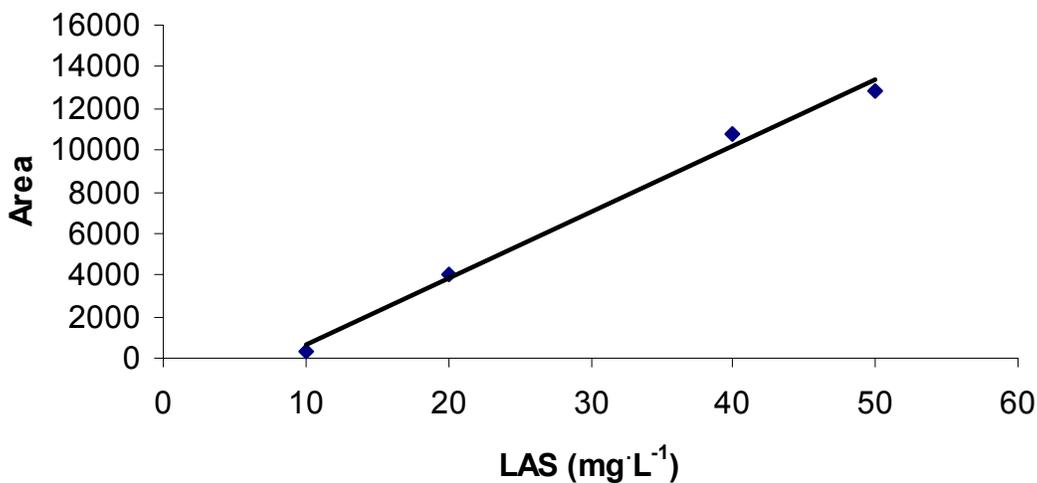
**Tabla 8.8** Curva estándar de metano.

Área de CH <sub>4</sub>	Área CO <sub>2</sub>	Fracción CH <sub>4</sub>	CH <sub>4</sub> /CH <sub>4</sub> +CO <sub>2</sub>
0	620865	0	0.0000
0	554816	0	0.0000
45962	496980	0.1	0.0847
39899	438944	0.1	0.0833
80979	365188	0.2	0.1815
97383	459037	0.2	0.1750
102796	285994	0.3	0.2644
131868	385979	0.3	0.2546
165958	274098	0.4	0.3771
167272	306132	0.4	0.3533
173722	216343	0.5	0.4454
215418	248365	0.5	0.4645
256737	212976	0.6	0.5466
238121	195626	0.6	0.5490
272696	138016	0.7	0.6640
292519	158846	0.7	0.6481
293612	95307	0.8	0.7549
297877	96386	0.8	0.7555
356061	55037	0.9	0.8661
311723	46412	0.9	0.8704
373257	5542	1	0.9854
405640	5096	1	0.9876

## 8.2.6 Curva estándar de LAS realizada por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

**Tabla 8.9** Curva estándar de LAS.

LAS (mg·L <sup>-1</sup> )	Área
10	318
20	4062
30	6545
40	10780
50	12822



**Figura 8.6** Curva estándar de LAS por HPLC (área = 317.26(LAS) - 2522.3 R<sup>2</sup> = 0.992).

## Publicación relacionada con la tesis

Almendariz, F.J., Meráz, M., Soberón, G. and Monroy, O. (2001). **Degradation of lineal alkylbenzene sulphonate (LAS) in an acidogenic reactor bioaugmented with a *Pseudomonas aeruginosa* (M113) strain.** *Water Science and Technology*, Vol. 44, No. 4, pp: 183-188.

# Degradation of lineal alkylbenzene sulphonate (LAS) in an acidogenic reactor bioaugmented with a *Pseudomonas aeruginosa* (M113) strain

F.J. Almendariz, M. Meráz, G. Soberón\* and O. Monroy

Departamento de Biotecnología, UAM, A. P. 55-535. 09340 Iztapalapa, D.F., Mexico.

E-mail: [monroy@xanum.uam.mx](mailto:monroy@xanum.uam.mx)

\* Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos Mexico

**Abstract** The degradation of of lineal alkylbenzene sulphonate (LAS) was studied in a two-stage anaerobic system where the acidogenic reactor was bioaugmented with a strain of *Pseudomonas aeruginosa* (M113). This is a strain, which under aerobic and denitrifying conditions uses LAS as carbon source. Results show that LAS was only degraded within the acidogenic stage while in the methanogenic reactor there was no degradation and eventually there was an inhibition due to a LAS accumulation in the sludge. During the experiment, the M113 strain remained in the acidogenic conglomerate (at around  $10^4$  CFU/mL) although there is no evidence of their involvement in LAS degradation.

**Keywords** Acidogenic stage; anaerobic digestion; lineal alkylbenzene sulphonate; methanogenic stage; *Pseudomonas aeruginosa* M113; UASB reactor

## Introduction

Surfactants are one of the most versatile products of the chemical industry. Such diversity is due to its use in the manufacturing of motor oils, pharmaceutical products, detergents, oil wells drilling and more recently in soil bioremediation (Rosen, 1978).

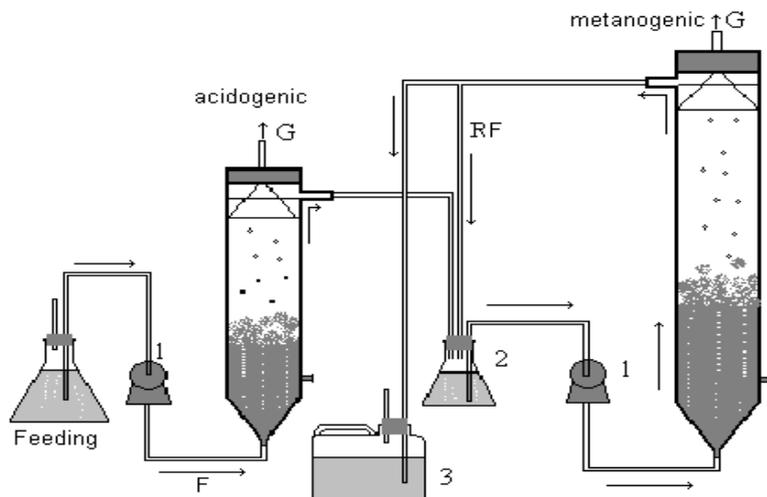
Lineal alkylbenzene sulphonates (LAS) are the world's most used surfactants. It has been demonstrated that this compound is not mineralized under anaerobic conditions because methanogenesis is inhibited (Wagener and Shink 1987; Federle and Shwab 1992; Krueger *et al.* 1998). One way of improving these processes is introducing microorganisms which have the capacity to biodegrade specific compounds recalcitrant for indigenous populations.

Terreros (1999), found that in a two-stage anaerobic digestion system (acidogenic and methanogenic), LAS is only degraded in the first stage with 35% efficiency and diminishing organic matter removal efficiencies which reflected LAS accumulation in the sludges of both reactors. The objective of this work was to improve the anaerobic LAS biodegradation in a two-stage system adding *Pseudomonas aeruginosa* (M113), which degrades branched alkylbenzene sulphonate (Soberón-Chávez *et al.*, 1996) using  $\text{NO}_3^-$  as electron acceptor.

## Methods

**Reactors.** Two upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors in series were used to separate anaerobic digestion in two stages: acidogenic (0.34 L and 6 h HRT) and methanogenic (1.35 L and 24 h HRT) at 35°C (Figure 1).

*Pseudomonas aeruginosa* Strain M113. This strain was obtained by Soberón-Chávez *et al.* (1996) at the Instituto de Biotecnología of the Universidad Nacional Autónoma de México. Under aerobic conditions it degrades 70% of branched alkylbenzene sulphonate, and it is resistant to chloramfenicol (Cm) and mercuric chloride ( $\text{HgCl}_2$ ).



**Figure 1** Two stage anaerobic digestion. 1. Peristaltic pumps; 2. Recirculation flask; 3. methanogenic reactor effluent. Gas outlet (G); Recirculation ratio (R), feed flowrate (F)

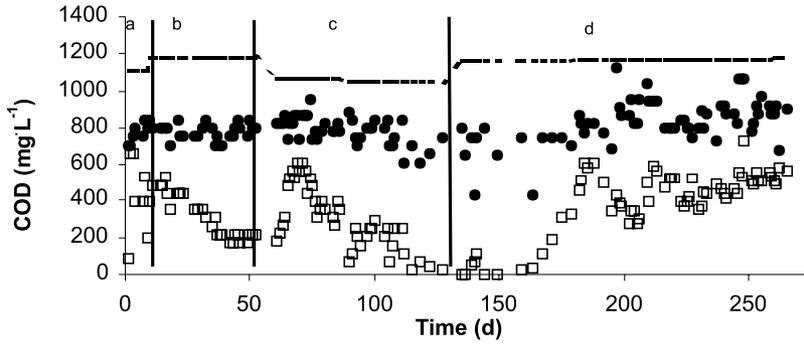
*Continuous degradation studies.* Two LAS (LAS 45, Hoechst México, D.F.) concentrations were tried; 20 and 50 mg·L<sup>-1</sup>. The feed was made of RAAM mineral media (Shelton and Tiedje, 1984) to which 1 g·L<sup>-1</sup> lactosa was added as carbon source. KNO<sub>3</sub> was the electron acceptor fed at a 1:1 ratio (LAS/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Strain M113, propagated in Luria medium in a 2 L flask, was inoculated to the acidogenic reactor by recirculating this media in order to retain most of these bacteria within the sludge.

*Analytical methods.* Strain M113 was plaque counted as colony forming units per volume (CFU/mL) of sludge. The RAAM medium with 0.7 g·L<sup>-1</sup> glucose and 0.3 g·L<sup>-1</sup> LAS, 30 mg·L<sup>-1</sup> chloramfenicol and 5 mg·L<sup>-1</sup> mercuric chloride. LAS was analysed as MBAS and organic matter as COD (APHA, 1995). Methane by gas chromatography using a Gow-Mac 550 GC, volatile fatty acids by a Hewlett Packard 5890-II GC, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> by capilar electrophoresis using a Waters Quanta 4000 CIA.

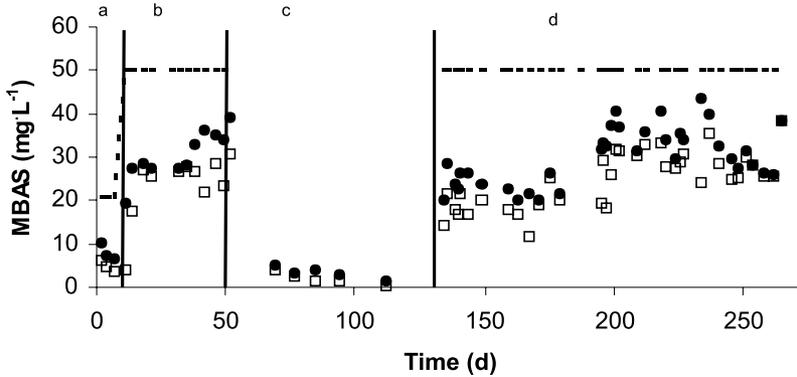
## Results and discussion

The COD removal efficiency in the acidogenic reactor (AR) was not affected by the presence of LAS (Figure 2) as it remained at 30% throughout the experiment even in the lapse when no LAS was fed (c). The methanogenic reactor (MR) was affected by the residual LAS from the AR. Figure 2 shows how after an initial 20 mg L<sup>-1</sup> of LAS an increase to 50 results in increasing COD removal efficiencies until it reaches 75%. When LAS was not fed (period c), there was an efficiency loss in the MR, which was recovered to 95% when the concentration of residual LAS was negligible (Figure 3). When the LAS addition was resumed, it affected the COD removal efficiency which dropped to 23%.

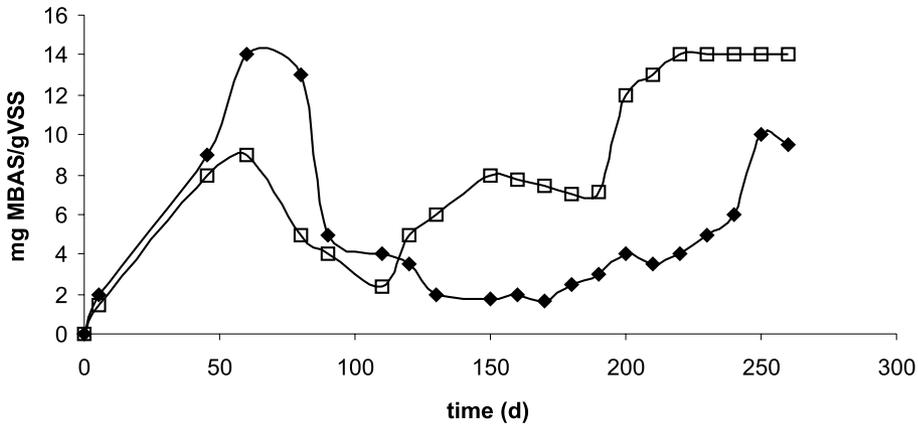
LAS is not degraded but adsorbed to the sludge in the reactors. At the beginning (Figure 3), there seems to be a removal efficiency of 68%, but when the concentration is increased to 50 mg/L it is accumulated to 9 and 14 mg<sub>MBAS</sub>·g<sub>SSV</sub><sup>-1</sup> for the acidogenic and methanogenic sludge, respectively (Figure 4) and the apparent removal efficiency decreased to 33%. When the LAS is not fed, it desorbes from the sludges. When the LAS feeding is resumed, the accumulation onto the sludges starts to increase again until activity is stopped in the MR when the concentrations are 14 and 10 mg<sub>MBAS</sub>·g<sub>SSV</sub><sup>-1</sup> for the acidogenic and methanogenic reactors, respectively.



**Figure 2** Organic matter removal a) 20 mg L<sup>-1</sup> LAS; b) and d) 50 mg L<sup>-1</sup> LAS; c) no LAS (--- feed, • AR effluent, □ MR effluent)

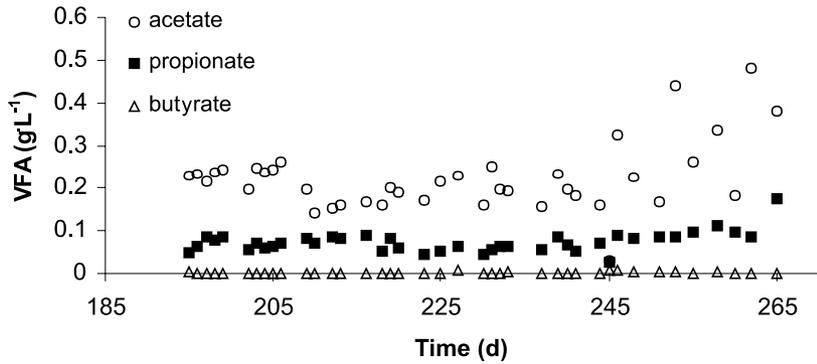


**Figure 3** LAS as methylene blue active substances (MBAS) a) 20 mg L<sup>-1</sup> LAS; b) and d) 50 mg L<sup>-1</sup> LAS and c) LAS free (--- feed, • AR effluent, □ MR effluent)

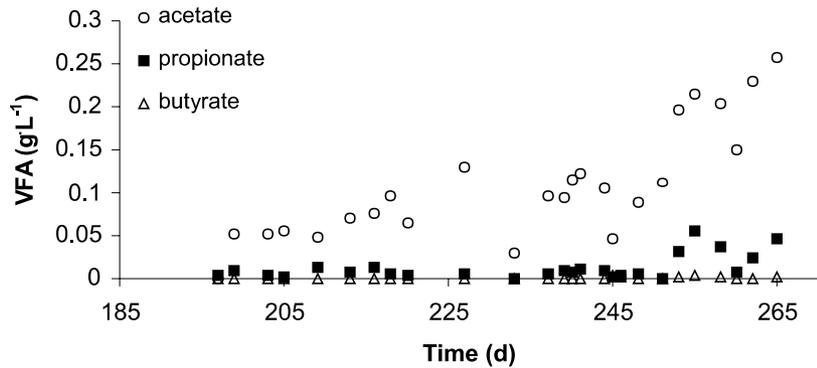


**Figure 4** LAS absorbed onto the acidogenic (□) and methanogenic (◇) sludges

The acidogenic (Figure 5) and methanogenic (Figure 6) reactors produced more VFA when LAS was accumulated onto the sludge reaching 81 and 50% of the total COD in the effluents. This suggests that acidogenic bacteria are not affected by LAS while the methanogens are.



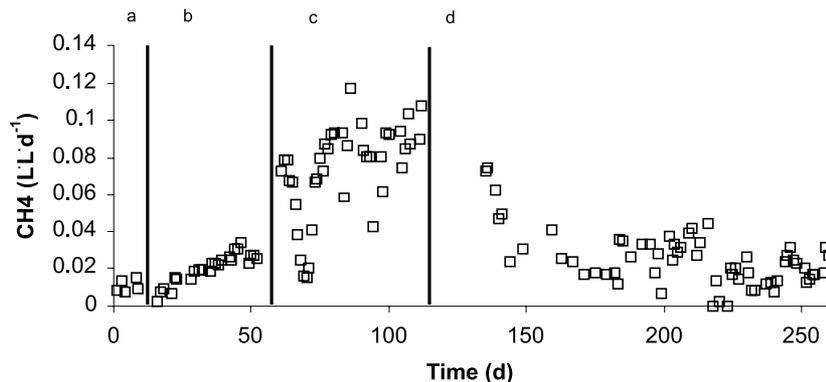
**Figure 5** VFA in the AR effluent when the LAS was found accumulated onto the sludge at 14 mg/gSSV



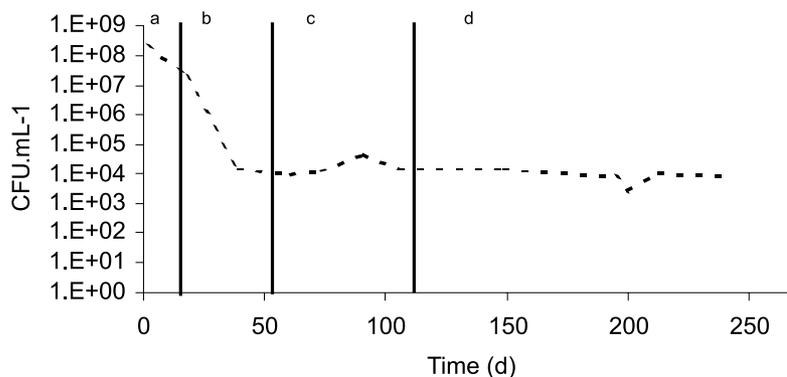
**Figure 6** VFA in the MR effluent during period d, when the LAS feed was restored and was absorbed onto the sludge at 10 mg/gSSV

Methane production (Figure 7) stops completely when LAS is fed to the reactor, recovering when LAS feeding is interrupted.

Strain M 113 did not adapted well to the acidogenic conglomerate although it remained in the reactor throughout all the experiment (Figure 9). The total count of strain M113 started to decrease from the first 40 days. The initial value was  $10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup> of sludge. After 40 days, the number dropped to  $10^4$  UFC·mL<sup>-1</sup> until it reached  $10^3$  by the end of the experiment. Nevertheless the NO<sub>3</sub><sup>-</sup> fed to the AR was consumed completely.



**Figure 8** Methane production in the MR a) 20 mg·L<sup>-1</sup> LAS; b) and d) 50 mg·L<sup>-1</sup> LAS and c) no LAS



**Figure 9** Strain M113 permanence in the acidogenic sludge

**Table 1** Comparison between *P. aeruginosa* M113 bioaugmented and non-bioaugmented acidogenic reactors

	Non-bioaugmented	Bioaugmented
Organic loading rate (gCOD·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )	6	4.82
LAS loading rate (gLAS·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )	0.8	0.2
COD removal (%)	24	30
LAS (gLAS·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )	0.8	0.21
LAS removal (%)	53	41
Reactor recovery (d)	70	78
LAS fed (g)	49	12
LAS out (g)	23	7.14
Feeding time (days)	160	175
LAS adsorbed (g)	0.05	0.035
LAS degraded (g)	26	4.86

Table 1 compares the performance of two systems working with and without the M113 strain. It can be seen that the bioaugmentation did not show an improvement in the process.

## Conclusions

LAS is degraded in the first stage mainly by the acidogenic bacteria. Although the surfactant is accumulated on the sludge, it does not inhibit the bacteria which returns a constant 800 mgCOD/L until it reaches an absorption equilibrium at 14 mgLAS/gVSS and the acetic acid production increases. It can degrade 41% of the LAS. On the other hand, the methanogenic reactor is inhibited by the surfactant but can recover when it is removed from the feed. It is not able to degrade the LAS, however, and eventually all methanogenic activity is stopped.

Strain M113 remained in the reactor in such a low concentration that it does not explain the removal rate of LAS as can be confirmed with a blank experiment with no inoculation of M113.

## References

- APHA, AWWA and WEF. (1995). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19th. Edition APHA, AWWA and WEF.
- Federle, T.W. and Schwab, B.S. (1992). Mineralization of surfactants in anaerobic sediments of laundromat wastewater pond. *Wat. Res.* **26**, 123–127.
- Krueger, C.J., Radakovich, K.M., Swayer, T.E., Barber, L.B., Smith R.L. and Field J.A. (1998). Biodegradation of the surfactant linear alkylbenzenesulfonate in sewage-contaminated groundwater: A comparison of column experiments and field tracer tests, *Environ. Sci. Technol.* **32**, 3954–3961.

- Rosen, M.J. (1978). *Surfactants and Interfacial Phenomena*. John Wiley & Sons. USA.
- Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential, *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 850–857.
- Terreros, J. (1999). Personal communication. Preparación de Tesis de Maestría en Biotecnología. UAM-Iztapalapa.
- Soberón-Chávez, G., Campos, J., Haïdour, J., Ramos, J.L. and Ortigoza, J. (1996). Selection and preliminary characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* strain mineralizing selected isomers in a branched-chain dodecylbenzenesulphonate mixture, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **12**, 000–000.
- Wagener, S. and Shink, B. (1987). Anaerobic degradation of nonionic and anionic surfactants in enrichment cultures and fixed-bed reactors, *Wat. Res.* **21**, 615–623.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

IDONEA COMUNICACION DE RESULTADOS

DEGRADACION DEL ALQUILBENCEN SULFONATO LINEAL (LAS) EN UN REACTOR ACIDOGENICO BIOAUMENTADO CON UNA CEPA DE *Pseudomonas aeruginosa* M113

En México, D.F. se presentaron a las 12:00 horas del día 21 del mes de NOVIEMBRE del año 2001 en la Unidad IZTAPALAPA de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del Jurado.

DRA. GLORIA SOBERON CHAVEZ;  
M. EN C. GLORIA MORENO RODRIGUEZ;  
M. EN B. FLOR DE MARIA CUERVO LOPEZ Y  
DRA. FLORINA RAMIREZ VIVES

bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última se reunieron a la presentación de la Idónea Comunicación de Resultados para la obtención del Grado de

Maestro en: BIOTECNOLOGIA

FRANCISCO JAVIER ALMENDARIZ TAPIA



quien presentó una comunicacion de resultados, cuya denominación aparece al margen y de acuerdo con el artículo 78 fracciones I, II, III y V del Reglamento de Estudios Superiores de esta Universidad, los miembros del Jurado resolvieron:

FRANCISCO JAVIER ALMENDARIZ TAPIA  
FIRMA DEL INTERESADO

aprobarlo

REVISO

LIC. CARMEN LLORENS FABREGAT  
DIRECCION DE SISTEMAS ESCOLARES

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

VISTO BUENO

DR. GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA  
DIRECTOR DE DIVISION

PRESIDENTA

DRA. GLORIA SOBERON CHAVEZ

VOCAL

M. EN C. GLORIA MORENO RODRIGUEZ

VOCAL

M. EN B. FLOR DE MARIA CUERVO LOPEZ

SECRETARIA

DRA. FLORINA RAMIREZ VIVES