

Universidad Autónoma Metropolitana
Iztapalapa
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Biotecnología



Casa abierta al tiempo

“Degradación de clorofenoles por sulfato-reducción en un reactor de lecho fluidizado de flujo descendente (LFFD)”

Tesis

Que para obtener el grado de
Doctor en Biotecnología

Presenta

M. en B. *Norberto Ulises García Cruz*

Comité Tutorial:

Directora: **Dra. Mónica Alicia Meraz Rodríguez**

Asesores: **Dra. Lourdes Berenice Celis García**

Dr. Héctor Mario Poggi Varaldo

MÉXICO D.F.

Febrero 2012

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo y fue financiado con el número de becario 181013.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Tratamiento de Aguas Residuales del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

México D.F. a 27 de febrero de 2012

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, **aprobó** la tesis:

“Degradación de clorofenoles por sulfato-reducción en un reactor de lecho fluidizado de flujo descendente (LFFD)”

Que presentó

M. en B. Norberto Ulises García Cruz

Comité tutorial:

Directora: **Dra. Mónica Alicia Meraz Rodríguez.**

Asesora: **Dra. Lourdes Berenice Celis García.**

Asesor: **Dr. Héctor Mario Poggi Varaldo.**

H. Jurado:

Dra. Marcia Guadalupe Morales Ibarria
Presidente, UAM-Cuajimalpa



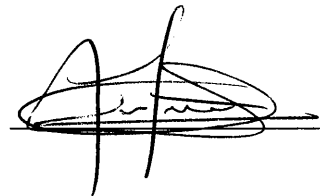
Dra. Lourdes Berenice Celis García
Secretaria, IPICYT



Dr. Héctor Mario Poggi Varaldo
Vocal, CINVESTAV



Dr. Iván Moreno Andrade
Vocal, LIPATA-UNAM, Campus Juriquilla



Agradecimientos

A Neith por apoyarme en todo momento durante todo mi doctorado, con su afecto y cariño.

A mis Padres por enseñarme a ser perseverante en la vida.

A mis hermanos Estrellita, Lalito y Gerita por siempre estar apoyándome con sus consejos y afecto.

A los Miembros del Jurado, Dra. Lourdes Celis, Dra. Marcia Morales, Dr. Ivan Moreno y Dr. Héctor Poggi, por sus valiosos comentarios y por la oportuna revisión de la tesis.

A mis compañeros de Laboratorio W-106 y de la UAM-I que me brindaron su amistad durante el tiempo del doctorado, Ricardo, Ulises D., Héctor, Uriel, Gehovana, Nancy, Miguel, Itzamna, Fernando, Alejandro, Carlos y David.

García Cruz Norberto Ulises (2011). Degradación de clorofenoles por sulfato-reducción en un reactor de lecho fluidizado de flujo descendente (LFFD). Resumen de Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México.

Resumen.

Los clorofenoles mono- y poli-sustituídos son químicos recalcitrantes distribuidos en ambientes terrestres y acuáticos ya que son utilizados como desinfectantes, fungicidas y herbicidas. Los clorofenoles han sido clasificados como sustancias orgánicas peligrosas que afectan al humano y el ambiente debido a su toxicidad. Estos compuestos se pueden acumular en los sedimentos provocando cambios en la biota y en las cadenas tróficas. Clorofenoles como el herbicida ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4D) y 2,4-diclorofenol (2,4DCF) se utilizan ampliamente para el control de malezas en cultivos. Estos clorofenoles entre otros, se han detectado en ambientes donde las bacterias sulfato reductoras (BSR) están presentes, causando toxicidad e inhibición de la sulfato-reducción. Sin embargo existen estudios en los que compuestos clorofenólicos como el 2-, 3- y 4-clorofenol (2CF,3CF y 4CF) han sido degradados bajo sulfato-reducción después de largos periodos de tiempo, por otra parte se han reportado BSR del género *Desulfitobacterium* capaces de degradar varios clorofenoles.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la toxicidad (CI_{50}) del 2,4D y sus posibles intermediarios en una biopelícula sulfato reductora desarrollada a partir de un lodo no adaptado, así como la degradación del 2CF en un reactor de lecho fluidizado de flujo descendente (LFFD), que por sus características hidrodinámicas y la recirculación ayuda a disminuir el efecto tóxico del compuesto, de forma paralela se operó un reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente (UASB por sus siglas en inglés) en ambos reactores se varió la concentración de la materia orgánica y sulfato y finalmente se modificó la relación DQO/SO_4^{2-} en el reactor LFFD.

Al evaluar la toxicidad con respecto al Consumo volumétrico máximo de sulfato (q_{max}), se observó que está disminuyó conforme se incrementaron las concentraciones de los clorofenoles, encontrándose que los compuestos di-sustituídos fueron más tóxicos que los mono-sustituídos. Por otra parte durante las cinéticas de toxicidad no se observó la deshalogenación de los clorofenoles y el índice de toxicidad (CI_{50}) siguió el siguiente patrón: 2,4DCF (CI_{50} de 0.106 mM) > 2,4D (0.131 mM) > 2CF (0.776 mM) > 4CF (0.84 mM). En cuanto al etanol que fue utilizado como fuente de carbono y electrones durante las cinéticas, se degradó casi en un 100% produciendo acetato, sin embargo en el ensayo con 4.66 mM de 4CF no fue metabolizado.

Se operó un reactor LFFD y se comparó con un reactor UASB para evaluar la aclimatación y degradación de 2CF. En ambos reactores se llevó a cabo mediante una estrategia de incrementos de concentración de ácido fórmico, sulfato y 2CF en tres etapas de 30 días cada una y un tiempo de residencia hidráulica (TRH) de 5 días, utilizando una concentración de 2CF por debajo de la CI_{50} (0.776 mM) calculada para este compuesto. El

Degradación de clorofenoles por sulfato-reducción en un reactor de lecho fluidizado de flujo descendente (lffd)
Norberto Ulises García Cruz

mayor consumo de 2CF en ambos reactores se observó en la primera etapa, del reactor UASB (50%) y LFFD (39%), cuando se alimentaron 24.4 ppm (0.19 mM), decayendo en las siguientes dos etapas a 21 y 14% para el reactor UASB y 18 y 23% para el reactor LFFD. Fenol y acetato fueron detectados en los reactores sólo en la primera etapa, lo que demostró que parte del 2CF fue deshalogenado. La fuente de carbono se consumió en un 100% durante el tiempo de operación en ambos reactores y el menor consumo de sulfato (SO_4^{2-}) se encontró en la tercera etapa, con un 78 y 55% para los reactores LFFD y UASB, respectivamente, a una concentración de 0.39 mM de 2CF.

Finalmente, se evaluó el efecto de la relación DQO-ácido fórmico/ SO_4^{2-} sobre la degradación de 2CF y se evaluaron las relaciones de 0.8 y 2.2, utilizando dos reactores LFFD en continuo. No obstante que el reactor a una relación de 2.2 fue alimentado con una mayor concentración de materia orgánica, se observó que en ambos reactores se consumieron aproximadamente 0.02 mM/d de 2CF lo que representó una eficiencia de remoción aproximadamente del 26%. A pesar de que el ácido fórmico fue adicionado en exceso para ser utilizado como fuente de electrones en la sulfato-reducción y la deshalogenación, éste último proceso no fue inducido. Por otra parte los perfiles de consumo de 2CF y sulfato indicaron que la deshalogenación de 2CF no está acoplada a la sulfato-reducción.

García Cruz Norberto Ulises (2011). Degradation of chlorophenols under sulfate reduction in a down flow fluidized bed (DFFB) reactor. Doctoral Thesis Abstract. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México.

Abstract

Mono- and poly-substituted chlorophenols are recalcitrant chemicals wide distributed in terrestrial and aquatic environments due to its wide use as disinfectants, fungicides and herbicides. Because of their toxicity, chlorophenols have been classified as hazardous organic substances that affect humans and the environment. These compounds can accumulate in sediments causing changes in biota and food chains. Chlorophenols such as the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4D) and 2,4-dichlorophenol are used for weed control in crops. These and other chlorophenols have been detected in environments where sulfate-reducing bacteria (SRB) are present, causing toxicity and inhibition on sulfate reduction, however, there are references where chlorophenols such as 2-, 3- and 4-chlorophenol have been degraded under sulfate reduction after long periods of time, SRB of the genus *Desulfitobacterium* have been reported elsewhere, as capable to degrade various chlorophenols.

The aim of this study was to evaluate the toxicity index (IC_{50}) of 2,4D and possible degradation intermediates by a sulfate-reducing biofilm, the 2CF degradation in a down flow fluidized bed (DFFB) and in an UASB reactors varying the organic matter and sulfate concentration, as well as the ratio variation of COD/SO_4^{2-} in the DFFB reactor.

During the toxicity evaluations the toxicity on the sulfate consumption rate (q_{max}), a decrease was observed when increasing chlorophenol concentrations were fed; the di-substituted compounds were more toxic than the mono-substituted ones. On the other hand during toxicity assays dehalogenation of chlorophenols was not observed and the toxicity index (IC_{50}) presented the following pattern: 2,4 DCP (IC_{50} of 0.106 mM) > 2,4D (0.131 mM) > 2CP (0.776 mM) > 4CP (0.840 mM). The ethanol utilized as a carbon and electron source, was consumed in the kinetics almost at 100%, however during the assay of 4CP at 4.66 mM the ethanol was not consumed.

The operation of the UASB and DFFB reactors to the acclimatization and degradation of 2CP, was carried out with increasing concentrations strategy of formic acid, 2CP and sulfate, in three stages of 30 days each, adding concentrations of 2CP below the IC_{50} (0.776 mM) calculated for this compound. The maximum consumption of 2CP in both reactors was observed during the first stage in the UASB (50%) and DFFB (39%) reactors, when 0.19 mM was added, declining in the following two stages to 21 and 14% in the UASB and 18 and 23% in the DFFB reactors. Phenol and acetate were detected in the reactors during the first-stage, which indicated 2CP dehalogenation and phenol and acetate utilization as electron donors. The carbon source was consumed in a 100% in both reactors during the operation time and the smaller sulfate consumption was found in the third stage, with 78%

and 55% for the DFFB and UASB reactors respectively, at a concentration of 0.39 mM 2CP.

Finally, the effect of COD/SO₄²⁻ ratio on the degradation of 2CP was tested using two ratios of 0.8 and 2.2. Although the reactor at a ratio of 2.2 was fed with a higher organic matter concentration, both reactors consumed approximately 0.1 mM of 2CP. Despite formic acid was fed in excess to be used as an electrons source for sulfate reduction and dehalogenation, the latter process was not fully induced. On the other hand, the consumption profiles of 2CP and sulfate indicated that the dehalogenation of 2CP is not coupled to sulfate reduction.

II. Materiales y métodos.....	30
2.1 Materiales.....	31
2.1.1 Enriquecimiento de biomasa en condiciones de sulfato-reducción.....	31
2.1.2 Parámetros operacionales de los reactores (UASB y LFFD).....	32
2.1.3 Inmovilización de la biopelícula sulfato reductora en el reactor LFFD.....	33
2.1.4 Operación en continuo del reactor LFFD.....	35
2.1.5 Medio de cultivo.....	36
2.1.6 Cinéticas de toxicidad.....	36
2.1.7 Operación de los reactores LFFD y UASB con incrementos de concentración de 2CF.....	38
2.1.8 Arranque y operación de reactores con diferente relación DQO/SO ₄ ²⁻ y concentración constante de 2CF.....	39
2.2 Métodos de análisis.....	40
2.2.1 Toma y almacenamiento de muestras provenientes de los reactores.....	40
2.2.2 Cuantificación de etanol y acetato.....	40
2.2.3 Cuantificación de clorofenoles y fenol.....	41
2.2.4 Cuantificación de ácido fórmico.....	42
2.2.5 Cuantificación de sulfato (SO ₄ ²⁻).....	42
2.2.6 Cuantificación de carbono inorgánico.....	43
2.2.7 Cuantificación de sulfuro disuelto.....	43
2.2.8 Medición de pH.....	44
2.2.9 Cuantificación de sólidos suspendidos volátiles (SSV).....	44
2.2.10 Cuantificación de biomasa inmovilizada.....	44
2.2.11 Cuantificación de bióxido de carbono.....	45

2.3	Cálculos.....	46
2.3.1	Cálculo del consumo máximo de sulfato.....	46
2.3.2	Cálculo de la CI_{50} para cada uno de los clorofenoles.....	46
2.3.3	Cálculo de la DQO teórica.....	47
2.3.4	Análisis estadísticos.....	48
III. Concentraciones inhibitorias de 2,4D y sus posibles intermediarios en una biopelícula sulfato reductora.....		49
3.1.	Introducción.....	50
3.2.	Resultados.....	52
3.2.1	Estudios de inhibición del proceso respiratorio del sulfato.....	52
3.2.2	Efecto inhibitorio de diclorofenoles.....	55
3.2.3	Efecto inhibitorio de monoclorofenoles.....	57
3.2.4	Valores de CI_{50} y su relación con la estructura molecular.....	59
3.3	Conclusiones.....	62
IV. Capacidad de degradación de 2-clorofenol en una biopelícula sulfato reductora y un lodo floculento con incrementos de concentración.....		63
4.1	Introducción.....	64
4.2	Resultados.....	66
4.2.1	Operación en continuo del reactor LFFD.....	66
4.2.2	Operación en continuo del reactor UASB.....	72
4.2.3	Balance de electrones.....	76
4.3	Conclusiones.....	78
V. Efecto de la relación DQO/SO_4^{2-} en la degradación del 2CF por una biopelícula sulfatoreductora.....		80
5.1	Introducción.....	81
5.2	Resultados.....	83

5.2.1 Operación del R1 a una relación DQO/SO ₄ ²⁻ de 0.8.....	83
5.2.2 Operación del R2 a una relación DQO/SO ₄ ²⁻ de 2.2.....	87
5.2.3 Balance de electrones para ambos reactores.....	89
5.3 Conclusiones.....	92
VI. Conclusiones generales.....	94
VII. Referencias bibliográficas.....	97
Anexos.....	106
Artículo y presentaciones en congresos derivadas de esta tesis.....	115

Lista de figuras

Figura 1.1. Principales reacciones químicas del Cl ⁻ en el agua.....	4
Figura 1.2 En el ambiente los microorganismos son los principales responsables de la degradación de los compuestos orgánicos halogenados.....	8
Figura 1.3. Mecanismos de deshalogenación.....	10
Figura 1.4. Intermediarios producidos durante la degradación del pentaclorofenol.....	12
Figura 1.5. Potencial reductor de los pares redox y los compuestos clorados.....	15
Figura 1.6. Árbol filogenético basado en el análisis del 16s ARN ribosomal de las familias en donde se encuentran ubicadas las bacterias sulfato reductoras.....	19
Figura 1.7. Ruta metabólica de la reducción del sulfato.....	20
Figura 1.8. Interacción de las BSR con los ciclos geoquímicos.....	22
Figura 1.9. Ruta de degradación de compuestos aromáticos clorados	29
Figura 2.1. Diagrama del reactor UASB.....	32
Figura 2.2. Diagrama de la configuración del reactor LFFD.....	34
Figura 2.3. Cálculo de la CI ₅₀	47
Figura 3.1. Perfiles de la degradación de (a) sulfato y (b) etanol en presencia de 2,4DCF a 0.06 y 0.766 mM.....	56

Figura 3.2. Perfiles de la degradación de (a) sulfato y (b) etanol en presencia de 2,4D a 0.02 y 0.34 mM.....	56
Figura 3.3. Degradación de sulfato (a y b) y etanol (c y d) en presencia de 2-clorofenol y 4-clorofenol.....	58
Figura 3.4. Valores obtenidos para los clorofenoles y el fenol.....	60
Figura 3.5. Relación entre el K_{ow} y la CI_{50} observada para el 2,4D.....	61
Figura 4.1. Perfil de 2CF (a) y sulfato y sulfuro (b) durante la operación en continuo del reactor LFFD.....	68
Figura 4.2. Formación de acetato y fenol (a) y consumo de ácido fórmico (b) durante la operación del reactor LFFD.....	70
Figura 4.3. Perfil de pH y E° en el reactor LFFD durante los incrementos de carga.....	71
Figura 4.4. Perfil de consumo de 2CF (a) y SO_4^{2-} (b) en el reactor UASB.....	73
Figura 4.5. Producción de fenol y acetato (a) y consumo de ácido fórmico (b) durante la operación del reactor UASB.....	75
Figura 4.6. Perfil de pH y E° durante la operación del reactor UASB.....	75
Figura 5.1. Perfil de degradación del 2CF en el R1.....	84
Figura 5.2. Consumo de sulfato (a) y de ácido fórmico (b) en el R1.....	85
Figura 5.3. Perfil de degradación del 2CF en el R2.....	87
Figura 5.4. Perfiles de consumo de sulfato (a) y de ácido fórmico (b) durante el tiempo de operación del R2.....	89
Figura 5.5. Posible efecto del 2CF en el consumo de sulfato.....	91

Lista de tablas

Tabla 1.1. Producción y usos de compuestos halogenados orgánicos.....	3
Tabla 1.2. Propiedades físico-químicas de algunos clorofenoles de interés.....	5
Tabla 1.3. Reacciones implicadas en la sulfato reducción.....	20
Tabla 2.1. Parámetros operacionales aplicados al reactor UASB.....	32
Tabla 2.2. Condiciones de operación del reactor en continuo.....	35
Tabla 2.3. Composición del medio mineral propuesto por Visser (1995)	36
Tabla 2.4. Concentraciones utilizadas para cada compuesto ensayado.....	37
Tabla 2.5. Concentraciones de los sustratos y compuestos tóxicos utilizados para los reactores en cada etapa.....	38
Tabla 2.6. Condiciones de operación y concentraciones de los sustratos utilizados para los reactores a diferente relación DQO/SO ₄ ²⁻	40
Tabla 2.7. Valor de la DQO teórica para cada compuesto	47
Tabla 3.1. Consumo de sustratos durante el estado estacionario del reactor LFFD	52
Tabla 3.2. Velocidad volumétrica de sulfato reducción y relación aceptor-donador.....	54
Tabla 3.3. Valores de la CI ₅₀ de los compuestos fenólicos ensayados.....	54
Tabla 4.1. Concentraciones de los sustratos y 2CF para los reactores en cada etapa.....	67
Tabla 4.2. Balance de azufre para el reactor LFFD y UASB en las tres etapas.....	71
Tabla 4.3. Balance de carbono para el reactor LFFD y UASB en las tres etapas.....	72
Tabla 4.4. Balance de electrones para ambos reactores en cada etapa.....	76
Tabla 5.1. Condiciones de operación y concentraciones de los sustratos utilizados para los reactores a diferentes DQO/SO ₄ ²⁻	83
Tabla 5.2. Consumo y producción de especies azufradas y carbonadas.....	86
Tabla 5.3. Balance de electrones en los dos reactores.....	90

Notación

ATP	Adenosín trifosfato
BSR	Bacterias sulfato reductoras
<i>B_v</i>	Velocidad de carga orgánica
2CF	2-Clorofenol
4CF	4-Clorofenol
CI₅₀	Concentración que inhibe el 50% del proceso respiratorio
COT	Carbono orgánico total
2,4D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2,4DCF	2,4-diclorofenol
DQO	Demanda química de oxígeno
<i>E</i>^o	Potencial oxido-reducción
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
eq e⁻	Equivalentes de electrones
etOH	Etanol
<i>K_{ow}</i>	coeficiente de partición octanol/agua
LFFD	Reactor de lecho fluidificado de flujo descendente
meq e⁻	Miliequivalente de electrones
MCPA	Ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético
MCPP	Ácido 2-(4-cloro)-2-metilfenoxi propiónico
mV	Milivolts
PM	Peso molecular (g/mol)
<i>Q_L</i>	Flujo volumétrico
<i>q_{max}</i>	Consumo volumétrico máximo de sulfato
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
SVI	Sólidos volátiles inmovilizados
TRH	Tiempo de residencia hidráulica
RUASB	Reactor upflow anaerobic sludge blanket (Reactor de lecho de lodos de flujo ascendente)

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Panorama General

Los compuestos halogenados orgánicos son aquellas moléculas que en su estructura contienen un sustituyente halogenado (F, Br, I ó Cl). Estas sustancias constituyen uno de los grupos de compuestos que se producen en mayor cantidad en la industria química para la fabricación de fungicidas, solventes, catalizadores y pesticidas (herbicidas e insecticidas) entre otros, por otra parte, también se pueden producir como intermediarios durante la producción de diversas sustancias (Fetzner y Lingens, 1994).

Entre los compuestos halogenados, los orgánicos clorados son los de mayor espectro de aplicación, en este grupo se encuentran: clorometanos, cloroetanos, cloroetenos, parafinas cloradas y aromáticos clorados (Tabla 1.1) (Hägglom y Dossert, 2003). A este grupo pertenecen los toluenos clorados, cloro-bencenos y clorofenoles, estos últimos son fabricados mediante la cloración del fenol. Los clorofenoles son los compuestos, los cuales contienen uno o más enlaces covalentes de cloro (Cl) y comprenden el pentaclorofenol, tetraclorofenol, triclorofenol, diclorofenol y monoclorofenol, estas moléculas tienen una amplia variedad de usos y aplicaciones como materia prima en la industria, a nivel mundial, para la fabricación de: plásticos, catalizadores, explosivos, detergentes, colorantes y medicinas (Glezer, 2003).

En el caso de la industria farmacéutica, por ejemplo, se utiliza 4-clorofenol para la fabricación de antisépticos por su actividad antimicrobiana. Además se encuentra presente en los productos de desinfección que se emplean en hogares, hospitales y granjas. Por otra parte también es usado ampliamente en la industria petroquímica para la producción de conservadores para la madera (Glezer, 2003), como el pentaclorofenol, el cual también es aplicado como plaguicida, mientras que los tetraclorofenoles se emplean como principio

activo para la fabricación de fungicidas (HSDB, 2010), los triclorofenoles y diclorofenoles como el 2,4,5-triclorofenol y 2,4-diclorofenol son utilizados como materia prima para la síntesis de los herbicidas Silvex y 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), respectivamente (WHO, 2001). Entre los monoclorados el 2-clorofenol es utilizado en la industria para la síntesis de compuestos orgánicos, para la extracción de azufre y nitrógeno en el carbón, así como la fabricación de sustancias retardadoras de fuego (HSDB, 2010).

Tabla 1.1. Producción y usos de compuestos halogenados orgánicos.

Compuesto	Producción [ton X10 ³ (año de estimación)]					Usos
	Europa	Estados Unidos	México	Japón	Otros países	
Clorometanos (mono, di y tri)	780(1983) ^{a,b}	924(1992) ^{a,b}		205(1983)		Desengrasantes Silicones Teflón
Cloroetanos (mono, di y tri)	8190(1985) ^{a,b}	7624(1991) ^{a,b}	3299(2007) ^c		300(1984) ^a	Solventes Pegamentos Textiles
Cloroetenos (mono, di, tri y tetra)	5200(1985) ^{a,b}	6220(1992) ^{a,b}		80(1984)	15148(1985)	PVC Copolímeros Pinturas
Parafinas cloradas					350(1986) ^a	Repelentes Plastificantes Plásticos
Clorados aromáticos						
Clorofenoles	40(1986) ^{a,b}	40(1986) ^{a,b}			100(1986) ^a	Herbicidas Insecticidas Antraquinona
Clorobencenos	125(1984) ^{a,b}		4787(2007) ^c		250(1984) ^a	Benzaldehído Estabilizadores
Clorotoluenos	30(1983) ^{a,b}					Preservadores Desinfectantes

^aFetzner, 1998, ^bBhatt y col., 2007. ^cINEGI, 2008.

Los cuerpos de agua pueden contaminarse con clorofenoles como resultado del uso de productos para la potabilización del agua como el Cl⁻ (Figura 1.1), debido a que éste reacciona químicamente con los residuos de fenol presente en el agua produciendo así diferentes isómeros (2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol) (Glezer, 2003); dichos compuestos también se han detectado, así como el 4-clorofenol como intermediarios durante la degradación de herbicidas como el Silvex y 2,4-D (Gibson y Suflita, 1990 y

Degradación de clorofenoles por sulfato-reducción en un reactor de lecho fluidizado de flujo descendente (Iffd)
Norberto Ulises García Cruz

1993). El 2-clorofenol también se ha detectado en las aguas residuales de la industria papelerá al reaccionar el Cl^- con el fenol proveniente de la lignina durante el blanqueo del papel (Figura 1.1) (HSDB, 2010).

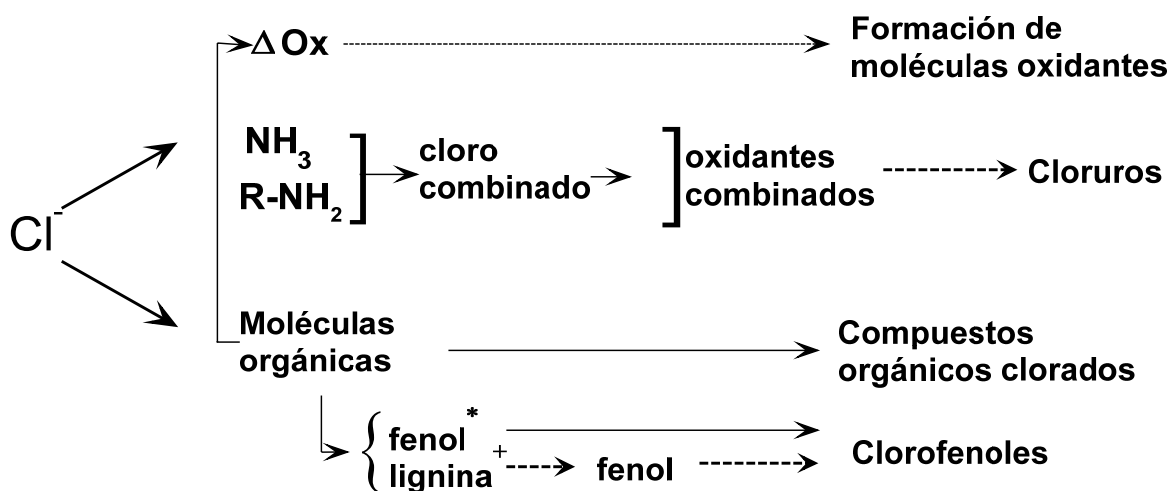


Figura 1.1. Principales reacciones químicas del Cl^- en el agua. Modificado de Abarnou y Miossec, 1992. ([†]Glezer, 2003; * Ali y Sreekrishnan, 2001).

En el caso de la contaminación atmosférica, la principal causa es la evaporación de los clorofenoles, estos compuestos tienen un efecto adverso debido a que cuando son llevados a estratos superiores reaccionan químicamente con el ozono desintegrándolo (Hägglom y Bossert, 2003). Otra de las fuentes de contaminación atmosférica es la incineración de los desechos municipales e industriales (Eklund y col., 1986). Mientras que los ambientes terrestres son contaminados por los derrames y desechos industriales principalmente (Hägglom y Bossert, 2003), así como el uso intensivo de herbicidas y pesticidas aplicados en las zonas agrícolas (Díaz, 2004).

Estos compuestos son tóxicos al ambiente y al humano por lo que se encuentran clasificados como residuos peligrosos y regulados por la norma mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, así como por la EPA [40 CFR 302.4, sección IV. D.3.b y 40 CFR 180.142(a)(13)]. Esta toxicidad se debe principalmente a sus propiedades físico-químicas (Tabla 1.2) lo que los vuelve recalcitrantes en el ambiente y con la lluvia pueden ser arrastrados con el agua y contaminar ríos, lagos y percolarse a mantos freáticos.

1.2 Toxicidad de clorofenoles

El uso generalizado e intensivo de los clorofenoles tiene como consecuencia que estén presentes en el ambiente (acuáticos o terrestres), llegando a acumularse en el tejido graso debido a que en su mayoría son moléculas parcialmente no polares por lo tanto hidrofóbicas con valores de K_{ow} (coeficiente de partición octanol/agua) mayores a 1, entre mayor sea el valor de K_{ow} más hidrofóbica es la molécula, como es el caso del 2,4DCF (Tabla 1.2). Por lo anterior, representan una amenaza para la biota en general (Goldberg, 1995); además su principal efecto en los organismos es el de desacoplar la fosforilación oxidativa afectando la producción de ATP (WHO, 1989).

Tabla 1.2. Propiedades físico-químicas de algunos clorofenoles de interés.

Compuesto	Clave	PM	Punto de ebullición (°C)	Punto de fusión (°C)	Densidad relativa	Solubilidad (g/L-H ₂ O)	Presión de vapor mmHg (°C)	Coeficiente de partición Octanol/agua (Log K _{ow})
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético ^{a,b}	2,4D	221.04	160	138	1.42	0.67	8 x 10 ⁻⁶ (25)	2.81
2,4-diclorofenol ^{a,c}	2,4DCF	163.00	210	45	5.6	4.5	10 (20)	3.06
4-clorofenol ^{a,d}	4CF	128.56	220	42.8	1.26	24.0	1 (50)	2.39
2-clorofenol ^{a,d}	2CF	128.56	174.9	9.8	1.26	11.3	2.5 (25)	2.15
Fenol ^a		94.11	181.75	40.91	1.071	82.8	0.35(25)	1.46

^aHSDB (Hazardous Substances Data Bank), ^bEXTOXNET (Extension Toxicology Network), ^cINCHEM (Chemical Safety Information), ^dMSDS(Material Safety Data Sheet).

1.3 Toxicidad en humanos y animales

La exposición en humanos se da principalmente en el personal que labora donde se emplean y se sintetizan este tipo de moléculas, como es el caso de los campesinos que trabajan en las zonas agrícolas. Estos compuestos pueden causar irritación en mucosas, producir convulsiones y finalmente la muerte, debido probablemente a las perturbaciones que generan estos compuestos a la ruta metabólica de la fosforilación oxidativa como se mencionó anteriormente y aunque pueden ser eliminados a través de la orina en ocasiones, los daños causados son irreversibles (Bradberry y col. 2004).

Por ejemplo, se ha observado que la exposición prolongada a 2-clorofenol puede afectar el sistema nervioso, causar problemas gastrointestinales, así como daño en el páncreas, entre otros. En caso de ingestión puede causar problemas respiratorios, e inclusive la muerte (HSDB, 2010). Se ha reportado que compuestos como el 2-, 3-clorofenol y 2,4-diclorofenol pueden promover la aparición de cáncer de piel en ratones, por otra parte el 2,4-diclorofenol y el 2,4,6-triclorofenol están incluidos en la lista de compuestos cancerígenos por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC, International Agency for Research on Cancer) (Pepelko y col. 2005).

En el ambiente pueden afectar insectos (*Pteronarcys sp*), peces (*Anguilla rostrata*, *Clarias batrachus* entre otras especies), y algunos crustáceos, donde se bioacumulan en el tejido graso de los animales afectando las cadenas tróficas y se biomagnifican (Munn y col., 2006). Se ha encontrado que en microorganismos y organismos inferiores tienen un efecto biocida (Davore y Fogarty, 2005). Debido a que estos compuestos son hidrofóbicos les permite disolverse en la membrana celular provocando la inestabilización de los procesos respiratorios llevados a cabo a este nivel, como la interrupción en el gradiente de

electrones y de iones como el K^+ , lo que conlleva a un cambio en el potencial de membrana y posiblemente a una muerte celular, se ha encontrado que conforme la K_{ow} se incrementa la toxicidad del compuesto también se incrementa (Chen y col. 2008, Sikkema y col. 1995).

1.4 Degradación de Compuestos Aromáticos

En la actualidad se han reportado estudios sobre la eliminación de estos compuestos en el agua, en donde se ha encontrado que estas moléculas así como algunos de los intermediarios que se generan durante su degradación son tóxicos a los microorganismos y persistentes en el ambiente, esto debido a las propiedades físico-químicas como la presión de vapor que tienen las cuales son bajas (Tabla 1.2) y la K_{ow} , por lo que se pueden acumular generando problemas ambientales en suelos, agua y aire (Hägglom y Bossert, 2003).

Entre los tratamientos que pueden utilizarse se encuentran los físico-químicos y los biológicos; los primeros no representan una solución real al problema, ya que en algunos casos, pueden generar sustancias que son más tóxicas o producir lodos químicos que se consideran residuos peligrosos y deben ser confinados, esto solo representa una solución temporal al problema, porque la toxicidad de los lodos no disminuye en los contenedores y si representa una amenaza al ambiente en caso de fuga o derrame. Por otra parte se ha observado que la aplicación de tratamientos fotoquímicos, térmicos, de incineración y fotólisis para la degradación de clorofenoles se han detectado la producción de compuestos secundarios altamente cancerígenos como el dibenzo-*p*-dioxina y dibenzofuranos (Glezer, 2003).

Los tratamientos biológicos (procesos aerobios y anaerobios) ofrecen una alternativa para la degradación y eliminación de compuestos aromáticos halogenados, debido a que

algunos los microorganismos han desarrollado la capacidad metabólica de eliminar o transformar estas moléculas. Estudios llevados a cabo en laboratorios han encontrado que algunos microorganismos son capaces de degradar la mayoría de las moléculas halogenadas producidas por el hombre y ambientalmente (Figura 1.2) (Hägglom y Bossert, 2003).

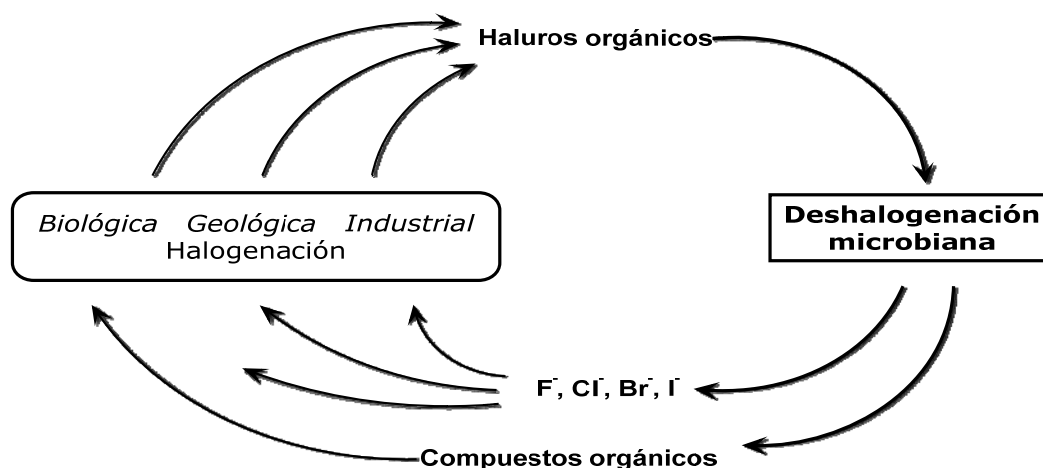


Figura 1.2. En el ambiente los microorganismos son los principales responsables de la degradación de los compuestos orgánicos halogenados (Tomado de Häggblom y Dossert, 2003).

La capacidad de degradar estos compuestos se debe a que los microorganismos se han adaptado a los clorofenoles presentes en la naturaleza en donde se encuentran alrededor de 3500 moléculas diferentes de haluros orgánicos provenientes de la naturaleza (Smidt y de Vos, 2004). Entre ellas la actividad volcánica, en donde los gases que se desprenden de la lava, producen diferentes clorofenoles, así mismo durante los incendios forestales el Cl⁺ del ambiente reacciona con la materia orgánica produciendo compuestos clorados, que son consumidos por las bacterias. Esta capacidad se ha desarrollado debido a que pueden codificar las secuencias genéticas para la expresión de enzimas como las deshalogenasas (Fetzner y Ligens, 1994). La expresión de este tipo de enzimas también se ve favorecida

gracias a que las secuencias genéticas para codificarlas se encuentran en transposones y plásmidos los cuales facilitan su transferencia a otras bacterias y por lo tanto se puede lograr una rápida adaptación (Díaz, 2004).

Otras fuentes biológicas que producen fenoles halogenados, son los microorganismos (bacterias, hongos y microalgas), los insectos (garrapatas, cucarachas y langostas), plantas superiores y algunos invertebrados marinos (gusanos poliquetos, moluscos y esponjas marinas entre otros) y algas (Öberg, 2002). Los ambientes marinos son la principal fuente biológica de estos compuestos (Castro, 2003), y no son necesariamente xenobióticos y por tal motivo los microorganismos han desarrollado la capacidad metabólica para degradarlos (Mogensen y col. 2003).

1.4.1 Mecanismos de deshalogenación

En la actualidad se conocen siete mecanismos de deshalogenación: Deshalogenación reductiva (Figura 1.3a) en donde el sustituyente halogenado es reemplazado por un hidrógeno con el consumo de 2 electrones. La deshalogenación reductiva se lleva a cabo bajo condiciones anaerobias (Commandeur y Parsons, 1990) la presencia de un co-sustrato como donador de electrones podría favorecer la deshalogenación (Field y Sierra-Alvarez, 2008; Mogesen y col. 2003). La deshalogenación oxigenolítica (Figura 1.3b) se lleva a cabo por enzimas oxigenasas las cuales incorporan de uno a dos átomos de oxígeno en la molécula. En la deshalogenación hidrolítica (Figura 1.3c), donde el sustituyente halogenado es reemplazado por grupos OH⁻ provenientes del agua. La deshalogenación tiorítica (Figura 1.3d) se caracteriza por la formación de un glutatión conjugado S-clorometil, como

producto intermediario, esta reacción es catalizada por la enzima glutatión S-transferasa, permitiendo la deshalogenación de la molécula.

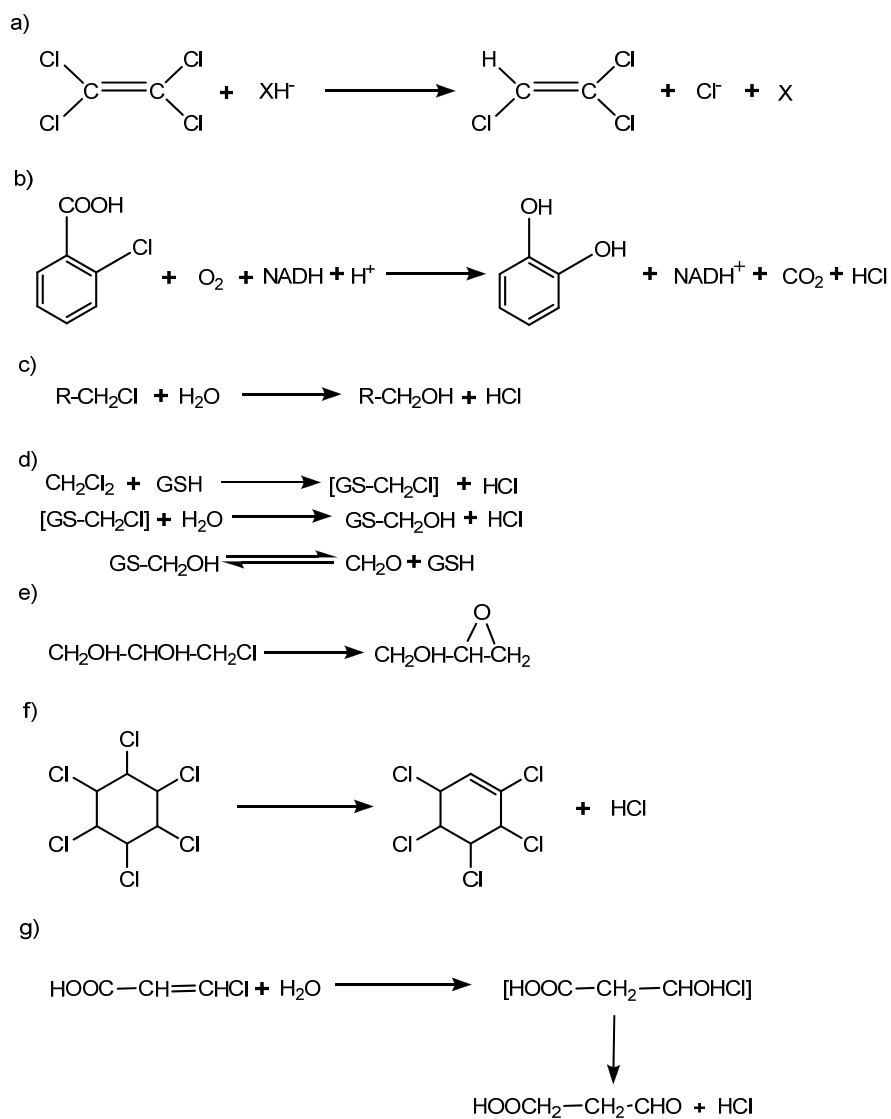


Figura 1.3. Mecanismos de deshalogenación. (a) Reductiva; (b) oxigenolítica; (c) hidrolítica; (d) tiolítica; (e) sustitución intramolecular; (f) dehidro-halogenación; (g) hidratación. GS⁻ = enzima glutatión S-transferasa.

En la sustitución intramolecular (Figura 1.3e) hay un desplazamiento nucleofílico en donde intervienen un grupo alcohol intramolecular lo que produce la deshalogenación. En la dehidro-halogenación (Figura 1.3f) el Cl⁻ es removido de la molécula, lo que conlleva a

la formación de un doble enlace en la misma. El último mecanismo es la reacción de hidratación (Figura 1.3g) que es llevada a cabo por enzimas hidratasas, las cuales incorporan una molécula de agua, desestabilizando el enlace favoreciendo la deshalogenación química (Fetzner y Lingens, 1994).

1.4.2 Degradación en condiciones aerobias

Como se mencionó en la sección anterior los microorganismos cuentan con diferentes mecanismos enzimáticos para remover el Cl⁻ del compuesto y poder metabolizar el producto como fuente de carbono y energía. La mayoría de las reacciones de deshalogenación son llevadas a cabo por bacterias aerobias en donde el O₂ termodinámicamente sirve de aceptor de electrones y metabólicamente es un co-factor en la catálisis de las reacciones (Löffler y col. 2003; Dolfing, 2003).

Bajo estas condiciones, algunos autores (Gaston y Locke, 2000) han llevado a cabo estudios en laboratorio utilizando muestras de suelo agrícola a diferentes profundidades de 0 a 30 cm, las cuales colocaron en botellas aireadas, para observar la degradación, adsorción y movilidad del herbicida Acifluorfen. A partir de la información anterior calcularon las isothermas de adsorción y el tiempo de degradación, y encontraron que la concentración de materia orgánica influye en los procesos de adsorción y degradación. Por otro lado Cederlund y col. (2007) y Young (2006) evaluaron la degradación de MCPA (ácido 4-cloro-2-metilfenoxiacético) y 2,4,5T (ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético) por co-metabolismo en campos agrícolas, agregando sal de dimetilamina, En ese trabajo se utilizó MCPA con marcaje radioactivo para seguir su degradación a través de la recuperación de ¹⁴C-CO₂, en ambos estudios observaron que la velocidad de degradación depende de la

especie de microorganismo así como del compuesto debido a que bajo estas condiciones existen diferentes rutas metabólicas (Figura 1.4) por las cuales los microorganismos deshalogenan y degradan las moléculas (Field y Sierra-Alvarez, 2008).

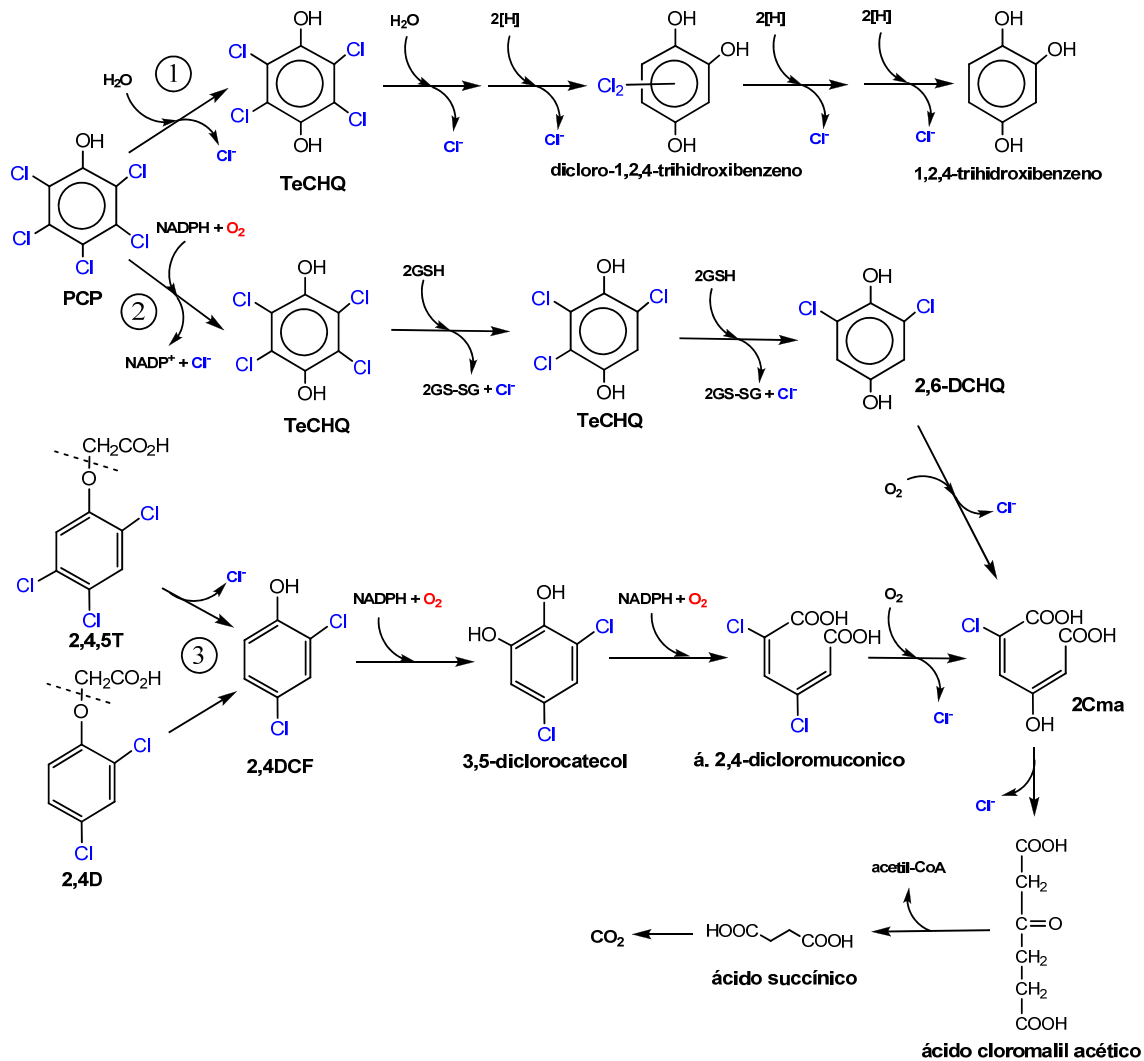


Figura 1.4. Intermediarios producidos durante la degradación del pentaclorofenol (PCP), ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5T) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D), bajo condiciones aerobias. En la actualidad se han reportado más de 5 rutas por las cuales se deshalogenan los diferentes compuestos halogenados. En la figura se describe la ruta metabólica para las bacterias: 1) *Sphingomonas chlorophenolica*, 2) *Mycobacterium chlorophenolicum* y 3) *Burkholderia cepacia* AC1100 y *Arthrobacter* sp. TeCHQ= *p*-tetraclorohidroquinona, 2GSH= glutatión S-transferasa, 2,6-DCHQ= 2,6-dicloro-1,4-hidroquinona, 2Cma= ácido 2-cloromaleilacético (Field y Sierra-Alvarez, 2008; Morgensen y col. 2003).

Las rutas metabólicas bajo condiciones aerobias se pueden revisar en los siguientes reportes: Field y Sierra-Alvarez, (2008), Bhatt y col. (2007), Morgensen y col. (2003), El Fantroussi y col. (1998), Fetzner, (1998), Annchhatre y Gheewala (1996), Fetzner y Lingens, (1994) y Commandeur y Parsons, (1990).

Varios autores han llevado a cabo estudios en lote para determinar la degradación utilizando herbicidas (2,4D, Dicloprop, MCPA y Metribuzin) como fuente de carbono y lodo proveniente de suelo agrícola, como inóculo. Encontraron que los suelos ricos en materia orgánica favorecen la degradación de los herbicidas, estos estudios se llevaron a cabo aireando el lodo (Thorstensen y Lode, 2001; Getenga y col., 2004; Robles-González y col., 2006). En otro trabajo llevado a cabo por Liphay y col. (2003) observaron la degradación *in-situ* de fenoxi herbicidas en acuíferos de agua dulce, que se atribuyó a la aclimatación de las comunidades microbianas debido al tiempo de exposición. En ese trabajo también se realizaron estudios de ecología microbiana y encontraron que hubo una selección de microorganismos hacia aquellos que fueron los capaces de sobrevivir y degradar los herbicidas.

Adicionalmente se ha observado que el compuesto 2,4D puede degradarse en condiciones de halofilia, estos experimentos se llevaron a cabo utilizando sedimento marino y agua de mar sintética con una salinidad del 10% (Grötzschel y col., 2004).

En un estudio llevado a cabo por Marrón-Montiel y col. (2006), aislaron *Comomonas sp*, *Pseudomona putida*, *Acinetobacter sp*, *Acinetobacter wolfii* y *Klebsiella oxytoca*, las cuales fueron capaces de crecer con 2,4-D como única fuente de carbono. Otros estudios reportan a las cepas *Sphingomonas sp* TFD44 y AW5, así como a *Stenotrophomonas maltophila*, capaces de deshalogenar estos compuestos (Mai y col., 2001; Smejkal y col.,

2001). Esta capacidad de deshalogenar también se ha observado en cultivos aislados en zonas agrícolas tratadas con fenoxialcanoatos (2,4D, MCPA y MCPP) por largos periodos de tiempo (Kilpi, 1980; Hallberg y col., 1991). En revisiones del tema llevadas a cabo por Parales y col. (2002) y Bhatt y col. (2007) recopilan las bacterias capaces de deshalogenar compuestos clorados bajo condiciones aerobias.

1.4.3 Degradación en condiciones anaerobias

Se ha reportado la degradación o deshalogenación parcial de varios tipos de compuestos aromáticos en los diferentes mecanismos anaerobios: desnitrificación, metanogénesis y sulfato-reducción (Hägglom y col., 2000; Milligan y Hägglom, 2001). Esto es posible ya que termodinámicamente se puede acoplar la deshalogenación reductiva a estos procesos, en donde hay una competencia parcial por los electrones con los pares redox de cada proceso, por el potencial reductor (E'°) de los compuestos halogenados que se encuentran en un intervalo de +260 a +480 mV (Figura 1.5) (Dolfing y Harrison, 1992), mientras que el E'° del par redox de la desnitrificación ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) es de +433 mV, el de la metanogénesis (CO_2/CH_4) de -240 mV y el de la sulfato-reducción ($\text{SO}_4^{2-}/\text{HS}^-$) de -220 mV (Dolfing, 2003), generando entre -130 y -180 kJ/mol por cada mol de Cl^- removido (Smidt y de Vos, 2004). Por tal motivo la velocidad de degradación de los clorofenoles se ve afectada por el tipo de aceptor alternativo de electrones presente en el medio y la posición del Cl^- en el anillo fenólico (Hägglom y col., 1993).

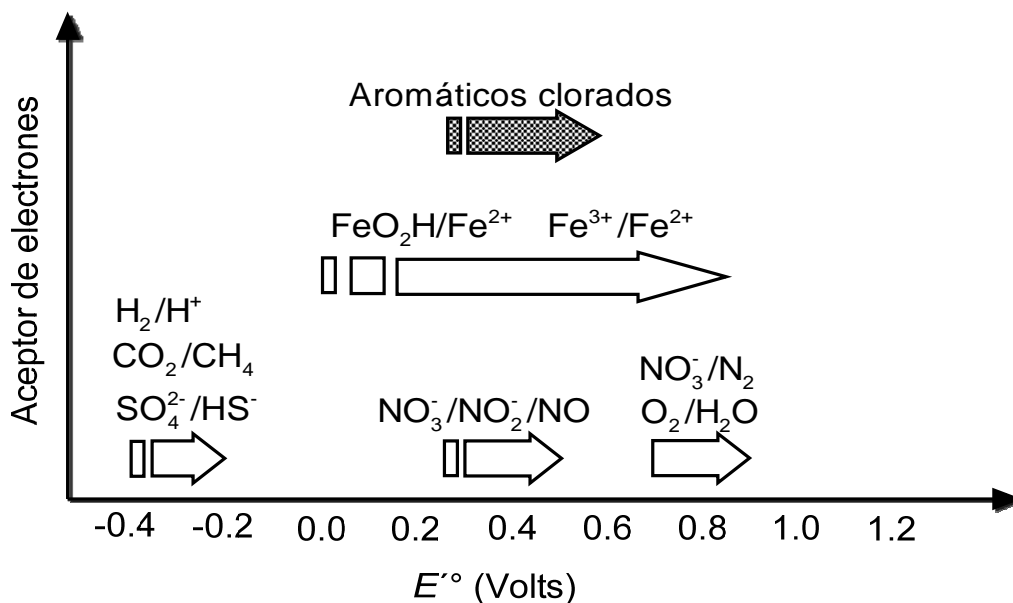


Figura 1.5. Potencial reductor de los pares redox y los compuestos clorados (Adriaens y Barkovskii, 2003).

1.4.4 Desnitrificación

Entre los primeros reportes de deshalogenación bajo condiciones desnitrificantes se encuentra el de Genthner y col. (1989) quienes reportaron la degradación de clorobenzoatos (2-, 3- y 4-clorobenzoato) en presencia de nitrito. En trabajos posteriores (Kazumi y col., 1995; Häggblom y col., 1996) se observó que la presencia de NO_3^- favorecía la degradación de clorobenzoatos en comparación con otros aceptores de electrones (SO_4^{2-} , Fe^{3+} y HCO_3^-). Häggblom y col. (1993) reportaron la degradación de clorofenoles (2-, 3- y 4-clorofenol) y clorobenzoatos (2-, 3- y 4-clorobenzoato) bajo condiciones de desnitrificación y observaron que los benzoatos clorados se degradaron en un menor tiempo comparado con los clorofenoles tratados bajo las mismas condiciones y con un consumo de carbono estequiométrico con respecto al nitrato alimentado. En otro estudio (Sanford y Tiedje, 1997) llevado a cabo con diferentes lodos provenientes de sitios

contaminados se evaluó la degradación de una mezcla de tres monoclorofenoles (2-, 3- y 4-
Degradación de clorofenoles por sulfato-reducción en un reactor de lecho fluidizado de flujo descendente (Iffd)
 Norberto Ulises García Cruz

clorofenol) y de 4 diclorofenoles (2,3-, 2,4-, 2,5- y 3,4-diclorofenol), durante los experimentos observaron que el nitrato se consumió por cometabolismo, debido a que se degradaron primero los clorofenoles y posteriormente el nitrato, paralelamente encontraron que los clorofenoles se deshalogenaron por varias vías, posiblemente debido a la presencia de diferentes poblaciones de bacterias, como podrían ser del género *Desulfitobacterium* (El Fantroussi y col., 1998), *Thauera*, *Pseudomonas* y *Ochrobactrum* (Bossert y col., 2003; Smidt y de Vos, 2004), entre otras bacterias desnitrificantes que pertenecen al grupo de las Protobacteria (Hägglom y Bossert, 2003). A la fecha existen varios reportes sobre la degradación de diferentes moléculas halogenadas en condiciones de desnitrificación como son el triclorometano (Bhatt y col., 2007), iodobenzoato (Hägglom y col., 1996), tricloroetileno (El Fantroussi y col., 1998), 2-cloroetanol (Smidt y de Vos, 2004), así como una amplia variedad de clorofenoles (Bae y col., 2002; Mongensen y col., 2003).

1.4.5 Metanogénesis

En condiciones metanogénicas se ha estudiado la degradación de una amplia variedad de clorofenoles (Milligan y Hägglom, 2001; Atuanya y Chakrabarti, 2003 y 2004; Becker y col., 2005), así como de fenol y cresoles (Boyd y col., 1983). Se ha observado que en mezcla son más tóxicos y que la toxicidad también se ve incrementada por la posición del cloro, además se ha encontrado que en la degradación de estas moléculas y sus intermediarios intervienen varios grupos de bacterias. Boyd y Shelton (1984), reportaron que el 2-clorofenol, 4-clorofenol y 3,5-diclorofenol fueron deshalogenados más rápidamente cuando el lodo fue adaptado previamente a fenoles. Un efecto similar se encontró al adicionar ácidos orgánicos de cadena corta (ácido fórmico, butírico, etc.) y

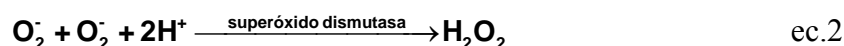
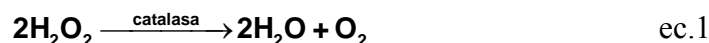
alcoholes (metanol y etanol), como fuente alterna de electrones durante la degradación del ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (Gibson y Suflita, 1990 y 1993).

En experimentos llevados a cabo con herbicidas del tipo fenoxi se observó que el primer paso en la degradación es la hidrólisis del enlace fenoxi, seguida de la deshalogenación (Zipper y col., 1999; Albrechtsen y col., 2001). Se observó que los clorofenoles fueron mineralizados hasta CH₄ y CO₂. Por otra parte estudios llevados a cabo en un reactor en lote secuencial acidogénico alimentado con 2,4D y glucosa, mostraron que el herbicida era transformado a ácidos grasos volátiles (AGV) y que la degradación de éste se favorecía con la presencia de glucosa (Chin y col., 2005).

1.4.6 Sulfato-reducción

1.4.6.1 Fisiología y bioquímica de las bacterias sulfato reductoras

Las bacterias sulfato reductoras (BSR) son un grupo, que fisiológicamente se podría considerar único debido a que pueden acoplar el crecimiento bacteriano con la respiración del sulfato (Barton y Plunkett, 2003). Aunque todas las BSR se han reportado como anaerobias estrictas, algunos géneros toleran condiciones aerobias o de microaerofilia gracias a enzimas como las catalasas y la superóxido dismutasa las cuales evitan la acumulación de iones OH⁻, H₂O₂ y del ión superóxido (O₂⁻) (ec. 1 y 2), ya que estos compuestos son más reactivos que el O₂ (Imlay, 2002) dañando al microorganismo, como se ha observado en estudios llevados a cabo con *Desulfovibrio gigas* (Beech, 2003).



Genéticamente las BSR se encuentran distribuidas en los dominios Bacteria y Archaea (Figura 1.6), ambos dominios pertenecientes a las procariotas. Entre las BSR que pertenecen al dominio Bacteria *phylum* Deltaproteobacteria se encuentran las de la familia Desulfobulbaceae, Desulfobacteraceae, Syntrophobacteraceae y los géneros *Desulfovibrio* spp y *Desulfomicrobium* spp entre otros (Figura 1.6). Otras especies se encuentran en los *phylum* Nitrospirae (*Thermodesulfovibrio islandicus* y *Thermodesulfovibrio yellowstonii*), Clostridia y Thermodesulfobacteria.

En el dominio de las Archaea se encuentra el género *Archaeoglobus* (Rabhus y col., 2006) perteneciente al *phylum* Euryarchaeota, en este dominio también se han descrito dos especies que se encuentran en el *phylum* Crenarchaeota (Figura 1.6).

Por otra parte recientemente se han descrito dos grupos de BSR, uno formado por la familia *Thermodesulfobiaceae* (Thauer y col., 2007) y otro de bacterias psicrófilas (*Desulfofrigus oceanense* gen. nov., sp. nov., *Desulfofrigus fragile* sp. nov., *Desulfofaba gelida* gen. nov., sp. nov., *Desulfotalea psychrophila* gen. nov., sp. nov. and *Desulfotalea arctica* sp. nov.) pertenecientes al filo Deltaproteobacterias aisladas a partir de sedimento marino del ártico (Knoblauch y col. 1999)

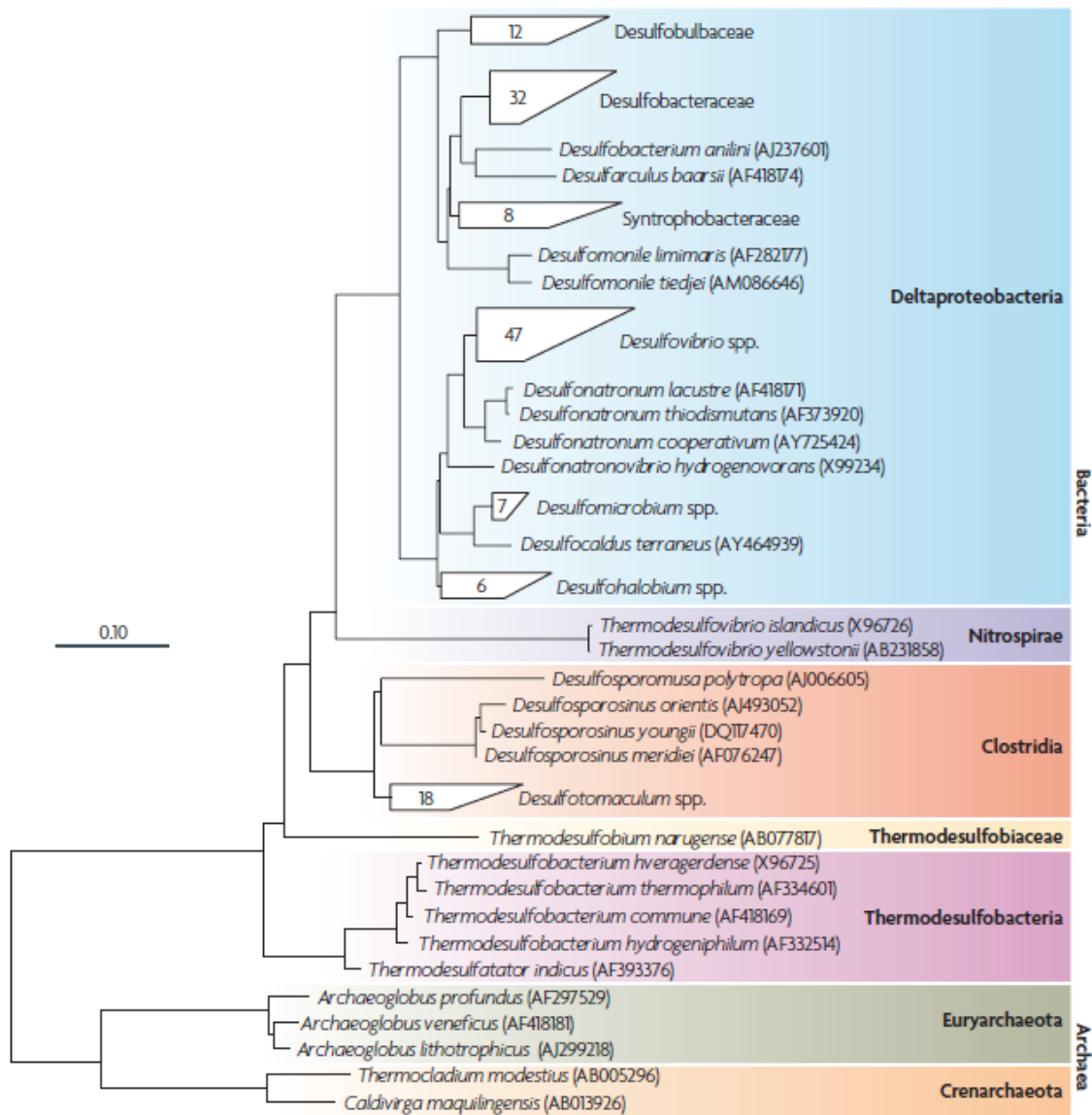


Figura 1.6. Árbol filogenético basado en el análisis del 16S ARN ribosomal de las familias en donde se encuentran ubicadas las bacterias sulfato reductoras (según Muyzer y Stams, 2008).

Las BSR para llevar a cabo la reducción no asimilativa del azufre, utilizan compuesto azufrados como son el sulfato, sulfito, tiosulfato, así como el azufre elemental, como aceptores de electrones, y son reducidos hasta HS^- (Tabla 1.3, Figura 1.7) (Barton y Plunkett, 2003), aunque debido a su versatilidad metabólica también son capaces de utilizar

en ausencia de sulfato el fumarato, NO_3^- , Mn^{4+} , Fe^{3+} y dimetil sulfóxido $((\text{CH}_3)_2\text{SO})$ como aceptores de electrones (Thauer y col., 2007).

Tabla 1.3. Reacciones implicadas en la sulfato-reducción (Barton y Fauque, 2009).

	Reacción	$\Delta G^{\circ'}$
(1)	$\text{SO}_4^{2-} + \text{ATP} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{APS} + \text{PP}_i$ (activación)	+46.0 kJ/mol
(2)	$\text{APS} + \text{H}_2 \rightarrow \text{HSO}_3^- + \text{AMP} + \text{H}^+$ (reducción)	-68.6 kJ/mol
(3)	$\text{HSO}_3^- + 3\text{H}_2 \rightarrow \text{HS}^- + 3\text{H}_2\text{O}$ (reducción)	-171.7 kJ/mol
(4)	$\text{SO}_4^{2-} + 4\text{H}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{HS}^- + 4\text{H}_2\text{O}$ (reacción global)	-152.2 kJ/mol

ATP= adenosín trifosfato, APS= adenil sulfato, AMP= adenosín monofosfato, PP_i = pirofosfato inorgánico.

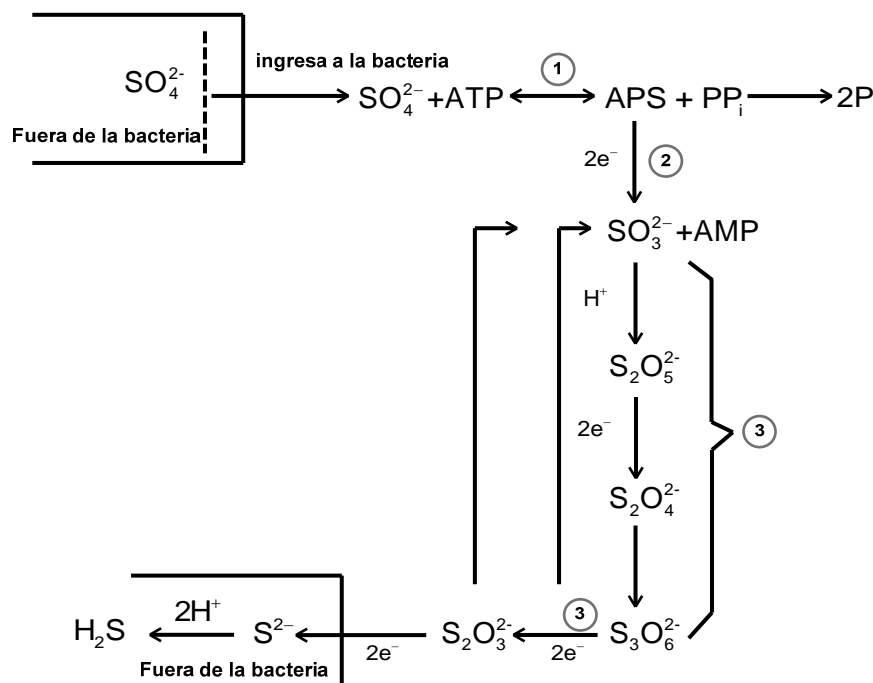


Figura 1.7. Ruta metabólica de la reducción del sulfato (Barton y Plunkett, 2003). 1) ATP-sulforilasa, 2) APS-reductasa y 3) bisulfito-reductasa.

Para llevar a cabo la sulfato-reducción las BSR requieren de un donador de electrones ya que para la reducción del sulfato (SO_4^{2-}) a sulfuro (HS^-) se necesitan 8 electrones como

se puede ver en la Figura 1.7, las bacterias los obtienen de la oxidación parcial o total

(mineralización) de compuestos orgánicos. Está reportado que las BSR utilizan una amplia variedad de compuestos (Muyzer y Stams, 2008), como son azúcares (fructosa, sacarosa y glucosa), amino ácidos (alanina, serina y glicina), alcoholes (metanol y etanol), ácidos grasos volátiles (ácido fórmico, ácido pirúvico, ácido láctico, entre otros), así como succinato, fumarato, malato y compuestos aromáticos (Rabhus y col. 2006; Barton y Plunkett, 2003). Liamleam y Annachhatre (2007) hicieron un análisis de varios donadores de electrones utilizados en la sulfato-reducción en donde determinan el rendimiento producto reducido-sustrato oxidado ($Y_{P/S}$) con respecto al consumo de sulfato dependiendo de la fuente de electrones y observaron que los compuestos con un mayor rendimiento fueron el H_2 , acetato, sacarosa así como el etanol.

Debido a la capacidad de consumir varios aceptores y donadores de electrones, las BSR interactúan de manera importante en los ciclos del nitrógeno y del carbono, así como de otros elementos como son el hierro, manganeso, selenio, mercurio, cromo, uranio y molibdeno (Figura 1.8) (Beech, 2003). Por otra parte también se ha observado que son capaces de generar y formar biopelículas en diferentes sustratos (Santegoeds y col. 1998). Durante este trabajo se definirá el término de biopelícula: como una acumulación de microorganismos en una superficie la cual no es necesariamente uniforme en tiempo o espacio, propuesta por Charaklis y Marshall (1990).

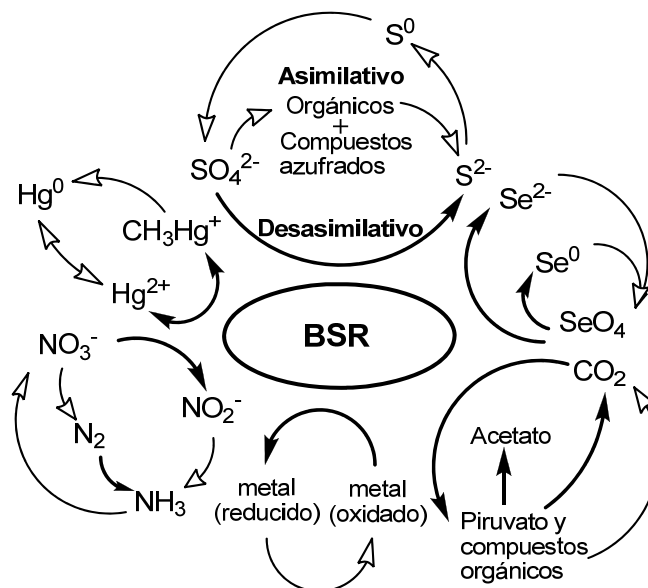


Figura 1.8. Interacción de las BSR con los ciclos geoquímicos (Barton y Plunkett, 2003).

1.4.6.2 Deshalogenación por sulfato-reducción

Como se mencionó anteriormente bajo condiciones anaerobias se han reportado diferentes bacterias metanogénicas, desnitrificantes y sulfato reductoras capaces de deshalogenar y degradar una amplia variedad de compuestos halogenados (El Frantroussi y col. 1998; Zhang y Benett, 2005). Bajo condiciones de sulfato-reducción el primer reporte de que una BSR fue capaz de degradar un compuesto halogenado (cloro benzoato) fue la bacteria *Desulfomonile tiedje* utilizando sulfato y sulfito como aceptores de electrones (DeWeerd y col., 1990), ésta fue aislada a partir de un lodo aclimatado a 3-clorobenzoato (Shelton y Tiedje, 1984). En la actualidad se han reportado bacterias de los géneros *Desulfovibrio* ssp, *Desulfuromonas* ssp, *Desulfomonile* spp y *Desulfitobacterium* spp, capaces de degradar clorofenoles, cloroetenos, así como clorobenzoatos bajo condiciones de sulfato-reducción (Holliger y col. 1999; Smidt y de Vos, 2004).

Se ha reportado que las BSR son capaces de deshalogenar algunos clorofenoles por deshalogenación reductiva (Figura 1.3), esto implica remover el átomo de halógeno de la molécula con la transferencia de 2 electrones. Esta reacción también depende del estado redox de la molécula, ya que muchos compuestos halogenados tienen un estado más oxidado que sus homólogos no halogenados y tienden a aceptar electrones y por ende a ser deshalogenados (Dolfing y Harrison, 1992). La degradación de clorofenoles por sulfato-reducción sigue vías similares a la metanogénesis, debido a que el primer paso es la sustitución de Cl^- por H^+ . (Gibson y Suflita, 1986; Kuhn y col., 1990). Se ha observado que en este proceso podría intervenir el H_2 proveniente de la fermentación incompleta de la fuente electrones y carbono (acetato, lactato, glucosa, etanol, butirato y fórmico) (Ehlers y Rose, 2006; Field y Sierra-Alvarez, 2008), por lo que se pueden acoplar la deshalogenación y la sulfato-reducción en un mismo proceso (Townsend y col., 1997).

En otro estudio se observó que los clorofenoles son degradados rápidamente cuando se utiliza un sedimento marino previamente adaptado, el cual estuvo en contacto con los clorofenoles por un periodo entre 150 a 200 días en lote (Hägglom y Young, 1990; Kohring y col., 1989). Hägglom y Young (1995) observaron la completa mineralización de clorofenoles hasta CO_2 utilizando sedimento marino previamente alimentado con una mezcla de clorofenoles por un periodo de un año.

Mohn y Tiedje (1992) encontraron que la transferencia de electrones para la deshalogenación del 3-clorobenzoato y la reducción del sulfato, se acopla a la producción de ATP, debido a que ambas reacciones termodinámicamente son favorables, en la sulfato-reducción la reacción global genera -152 kJ/mol (Tabla 1.3) aunque este valor puede variar dependiendo del donador de electrones (Liamleam y Annachhatre, 2007), mientras que los

clorofenoles generan entre -131 y -168 kJ/mol por cada Cl⁻ removido (Dolfing, 1992), con la adición del donador de electrones se obtuvo una disminución en el pH debido probablemente a la extrusión de protones a través de la membrana. Esto indica que los microorganismos pueden beneficiarse energéticamente de la deshalogenación de los compuestos halogenados. Lo que concuerda con los estudios llevados a cabo por Dolfing y Harrison (1992) en donde reportan el ΔG° para la reacción de diferentes compuestos aromáticos halogenados. En este estudio observaron que el intervalo de ΔG° para los compuestos aromáticos (clorobenceno y clorofenoles) se encuentra entre -130 a -171 kJ/mol. Lo que indica que la reacción de deshalogenación es favorable para el microorganismo y provee la suficiente energía para su crecimiento.

Sin embargo en estudios llevados a cabo en cultivos puros de *Desulfomonile tiedje* observaron que el SO₄²⁻ así como otros sulfoxianiones (tiosulfato y sulfito), a una concentración mayor de 5 mM puede conducir a una total o parcial inhibición de la decloración reductiva de 3-clorobenzoato, y en el caso del sulfato se observó una competencia con el compuesto halogenado por los electrones presentes en el medio ya que ambos actúan como aceptores (De Weerd y col., 1990). Por lo que la deshalogenación de los contaminantes puede ser estimulada con la adición de donadores de electrones o inductores como lactato, acetato, piruvato, etanol, glucosa e H₂ (Reineke, 2001).

Otros compuestos halogenados que han sido degradados bajo sulfato-reducción son el tetracloroetileno, tricloroetileno y hexacloroetano con la generación de sulfuro (Beeman y col., 1983), herbicidas: Dicamba y 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (Boyle y col. 1999; Mogensen y col. 2003), así como aromáticos clorados como el 2-, 3-, 4-clorofenol y pentaclorofenol, utilizando enriquecimientos de sedimentos marinos o cepas puras y en

algunos casos se emplearon donadores de electrones orgánicos para acoplar la deshalogenación reductiva (Sun y col. 2000). Durante la degradación del 2,4-D se observó que primero se rompe el enlace éter (Boyle y col. 1999; Zhang y Bennett, 2005), produciendo 2,4-diclorofenol, estos compuestos son deshalogenados por deshalogenación reductiva (Figura 1.9) en varias etapas dependiendo de la cantidad de átomos de cloro que contenga la molécula hasta producir fenol (Figura 1.9), posteriormente el fenol se carboxila produciendo hidroxibenzoato, el cual reacciona con la coenzima A para formar benzoil-CoA y ser degradado hasta acetato por la ruta de la benzoil-CoA (Harwood y col., 1999).

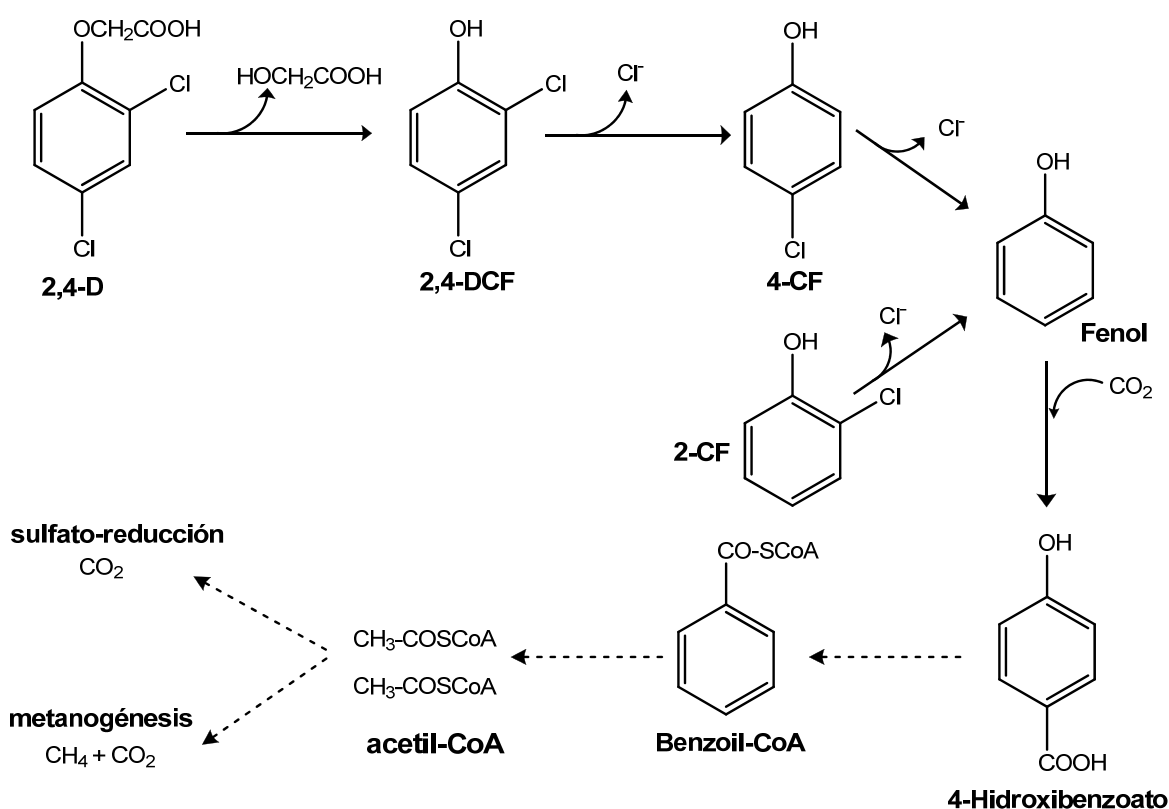


Figura 1.9. Ruta de degradación de compuestos aromáticos clorados. 2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 2,4-DCF) 2,4-diclorofenol, 4-CF) 4-clorofenol, 2-CF) 2-clorofenol (Harwood y col., 1999).

1.5 Justificación

La degradación de clorofenoles como son el 2,4D, así como los intermediarios que se producen 2,4DCF, 4CF y 2CF son de gran interés debido a la enorme cantidad que se descarga al ambiente (Hägglom y Dossert, 2003) y que por las altas concentraciones pueden resultar tóxicos a microorganismos, animales superiores y al humano (HSDB). En la actualidad se ha reportado que estos compuestos se pueden degradar bajo condiciones anaerobias en el ambiente (Holliger y col. 2003).

La mayoría de los estudios sobre degradación anaerobia y toxicidad se han enfocado a sistemas metanogénicos, en los cuales se ha estudiado la capacidad de degradación de clorofenoles utilizando diferentes reactores inoculados con sedimentos marinos así como con lodos floculentos y granulares, en estas investigaciones se ha observado que el primer paso en la degradación es la deshalogenación reductiva, en donde la molécula de Cl es sustituida por H⁺ (Gibson y Suflita, 1986). Mientras que los estudios de toxicidad se han llevado a cabo utilizando lodos metanogénicos y se ha calculado la concentración inhibitoria que causa 50% de reducción en la actividad (CI₅₀, mg/L). Los valores reportados para el 2CF, 4CF y 2,4DCF fueron de 160, 270 y 63 mg/L, respectivamente (Blum y Speece, 1991b).

En el caso de la sulfato-reducción los estudios sobre los niveles de toxicidad de los clorofenoles son muy escasos, en la actualidad solo se ha reportado el trabajo llevado a cabo por Uberoi y Bhattacharya (1997). En este estudio se evaluó la CI₅₀ de los clorofenoles con respecto al consumo de la fuente de carbono pero no se ha estudiado el efecto que tienen sobre la respiración del sulfato, así como las implicaciones toxicológicas que tiene la posición y el número de cloros en la molécula del fenol. De esta manera, se

requieren estudios para evaluar el efecto que tiene la configuración de la molécula sobre el proceso respiratorio y saber cómo se afecta el proceso sulfato reductor. El conocimiento de estos niveles de toxicidad es importante para plantear estrategias de remediación en el ambiente debido a que si la concentración del compuesto tóxico se encuentra por arriba de estos niveles puede causar inhibición y por ende detener el proceso de biodegradación llevado a cabo por los microorganismos.

Por otra parte, en los estudios de degradación en reactores anaerobios del 2CF, se ha encontrado que estos compuestos se pueden degradar tanto por metanogénesis como por sulfato-reducción (Hägglom y Dossert, 2003). Durante estos experimentos se ha observado que la biomasa (lodo granular y floculento) necesita periodos largos de aclimatación antes de adquirir la habilidad para degradar los clorofenoles, que van desde 45 a 200 días aproximadamente dependiendo de la configuración del reactor y del tipo de lodo utilizado. Por este motivo es necesario desarrollar estrategias para lograr aclimatar o seleccionar biomasa que degrade 2CF en periodos cortos de tiempo.

Por otra parte no se ha reportado la toxicidad que ejercen los clorofenoles sobre el metabolismo de BSR o las concentraciones a las que la toxicidad ocurre y la capacidad para interrumpir la porción reductiva del ciclo biogeoquímico del azufre. Por lo que en este trabajo se pretende evaluar la toxicidad de 4 clorofenoles (ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 2,4-diclorofenol, 4-clorofenol y 2-clorofenol) y del fenol, así como la adaptación y degradación en una biopelícula sulfato reductora en un reactor de lecho fluidificado de flujo descendente al 2-clorofenol, debido a que no hay reportes de degradación de este compuesto por biopelícula.

Por tal motivo para estudiar estos temas se propuso la siguiente hipótesis y objetivos de trabajo.

1.6 Hipótesis

Pregunta de investigación:

¿Los clorofenoles afectan el consumo de los sustratos?

Hipótesis: los clorofenoles ejercerán toxicidad sobre la respiración del SO_4^{2-} debido a que el cultivo no ha sido expuesto anteriormente a estos compuestos.

Pregunta de investigación:

¿Es posible ejercer una presión selectiva sobre consorcios sulfato reductores que induzca la detoxificación del compuesto clorado tóxico y la degradación del compuesto carbonado formado, aplicando incrementos en concentración de un compuesto tóxico monoclorado?

Hipótesis: Aumentos graduales en la concentración de un compuesto mono clorado favorecerán la selección de un consorcio microbiano capaz de deshalogenar el 2CF o ejercerán una presión ambiental sobre la población sulfato reductora la cual inducirá la deshalogenación y degradación del 2CF.

Pregunta de investigación:

¿La variación de la relación $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ alrededor de los valores estequiométricos afectará el proceso de detoxificación por deshalogenación?

Hipótesis: la variación de la relación DQO/SO_4^{2-} modificará la cantidad de materia orgánica y por lo tanto la cantidad de electrones disponibles para llevar a cabo de manera simultánea la deshalogenación del compuesto tóxico y la sulfato-reducción, la sulfato-reducción se presentará en la medida en la que se lleve a cabo la detoxificación del compuesto monoclorado.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de varios clorofenoles en el consumo del SO_4^{2-} en un sistema en lote y el efecto del incremento de la concentración y de la relación DQO/SO_4^{2-} en la adaptación y degradación del 2CF en un sistema en continuo, al operar un reactor de lecho fluidificado de flujo descendente (LFFD).

1.7.2 Objetivos particulares

- Determinar los valores de CI_{50} para el 2,4D, 2,4DCF, 4CF, 2CF y fenol con respecto al consumo de SO_4^{2-} en una biopelícula sulfato reductora.
- Favorecer la degradación de 2CF en un reactor LFFD con biopelícula sulfato reductora y en un reactor UASB inoculado con lodo floculento utilizando incrementos de la concentración.
- Evaluar el efecto de la variación de la relación DQO/SO_4^{2-} en la adaptación y degradación de 2CF.

II. Materiales y métodos

En el presente Capítulo se detallan los materiales y métodos utilizados en el desarrollo de la parte experimental, la cual se compuso de 4 etapas: 1) enriquecimiento del lodo, 2) inmovilización de biomasa, 3) evaluación de la toxicidad de compuestos clorados sobre la biopelícula, 4) Operación de un reactor LFFD para la eliminación de 2CF con incrementos de concentración y su comparación con un reactor UASB para evaluar la biomasa en la degradación del clorofenol y 5) variación de la relación DQO/SO_4^{2-} con variaciones en la cantidad de donador de electrones para la degradación de 2CF.

2.1 Materiales

2.1.1 Enriquecimiento de biomasa en condiciones de sulfato-reducción

Para la inoculación del reactor (LFFD) se enriqueció biomasa, en condiciones de sulfato reducción, en un reactor UASB de vidrio con un volumen de 1.47 L (\emptyset 6.5 cm y altura de 30 cm) (Figura 2.1), por un periodo de un mes. El reactor UASB fue inoculado con 0.5 L de lodo proveniente de la planta de tratamiento de aguas residuales de la UAM-I, con una concentración de sólidos suspendidos volátiles (SSV) de 39.3 g/L, y permaneció en un cuarto a temperatura controlada a 30°C. Se utilizó el medio mineral diseñado por Visser (1995) para bacterias sulfato reductoras ajustando el pH a 6.6. Las condiciones de operación se muestran en la Tabla 2.1.

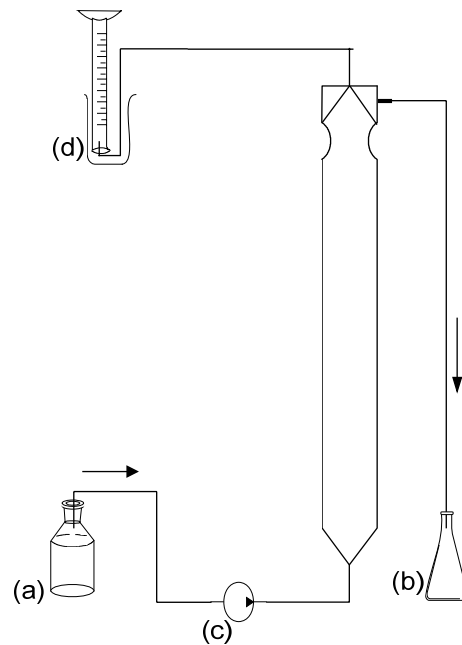


Figura 2.1. Diagrama del reactor UASB. a) influente, b) efluente, c) bomba peristáltica y d) salida y colector de biogás.

Tabla 2.1. Parámetros operacionales aplicados al reactor UASB para el enriquecimiento de biomasa sulfato reductora.

Q_L (mL/d)	TRH (días)	Fuente de carbono	Concentración ($\frac{\text{gDQO} - \text{á. láctico}}{\text{L}}$)	B_V ($\frac{\text{gDQO}}{\text{L-día}}$)	Fuente de azufre	B_VSO_4 ($\frac{\text{gSO}_4^{2-}}{\text{L-día}}$)	Relación $\frac{\text{DQO}}{\text{SO}_4^{2-}}$
0.5	2	ácido láctico	2.0g	1.0	Na ₂ SO ₄	1.315	0.76

2.1.2 Parámetros operacionales de los reactores (UASB y LFFD)

$$\text{Tiempo de residencia hidráulica} = \text{TRH} = \frac{V_r}{Q_1} \quad (\text{ec. 3})$$

$$\text{Tasa de recirculación} = R = \frac{RF}{Q_1} \quad (\text{ec. 4})$$

$$\text{Velocidad de carga orgánica} = B_V = \frac{Q_1 [\text{DQO}]_{\text{in}}}{V_r} \quad (\text{ec. 5})$$

$$\text{Velocidad de carga de sulfato} = BvSO_4^2 = \frac{Q_1 [\text{SO}_4^{2-}]_{in}}{V_r} \quad (\text{ec. 6})$$

Donde: V_r = volumen del reactor (L).

Q_1 = gasto volumétrico de alimentación (L/d).

RF = gasto volumétrico de recirculación (L/d)

$[DQO]_{in}$ = concentración de DQO en el influente (g/L)

$[\text{SO}_4^{2-}]$ = concentración de sulfato en el influente (g/L)

2.1.3 Inmovilización de la biopelícula sulfato reductora en el reactor LFFD

La inmovilización de la biopelícula se llevó a cabo en un reactor fabricado de acrílico (altura 90 cm, Ø 6 cm), con un volumen de 2.54 L (Figura 2.2). Se utilizaron bombas peristálticas para el suministro de la alimentación y para la recirculación que provee la expansión del lecho. La biopelícula se inmovilizó en polietileno el cual fue molido y posteriormente tamizado, para obtener partículas con un diámetro promedio de 0.6 mm y una densidad aparente de 400 kg/m³. Las partículas de polietileno que se utilizaron en el reactor se acondicionaron para favorecer su movilidad en la fase líquida del reactor poniéndolas en un vaso de precipitados de 4 litros que contenía 2 litros de agua destilada con 2 g de peptona de caseína. Se mantuvieron en agitación media por un periodo de 24 horas en una parrilla de agitación. Una vez acondicionadas se alimentó el reactor con medio utilizando etanol (2 gDQO-etanol/L) como fuente de carbono con una relación DQO/SO₄²⁻ =0.76.

Por la parte superior del reactor, se adicionó un volumen de 0.762 L de soporte que corresponde al 30% del volumen del reactor, posteriormente fue inoculado y se mantuvo en un cuarto a temperatura constante a 30°C.

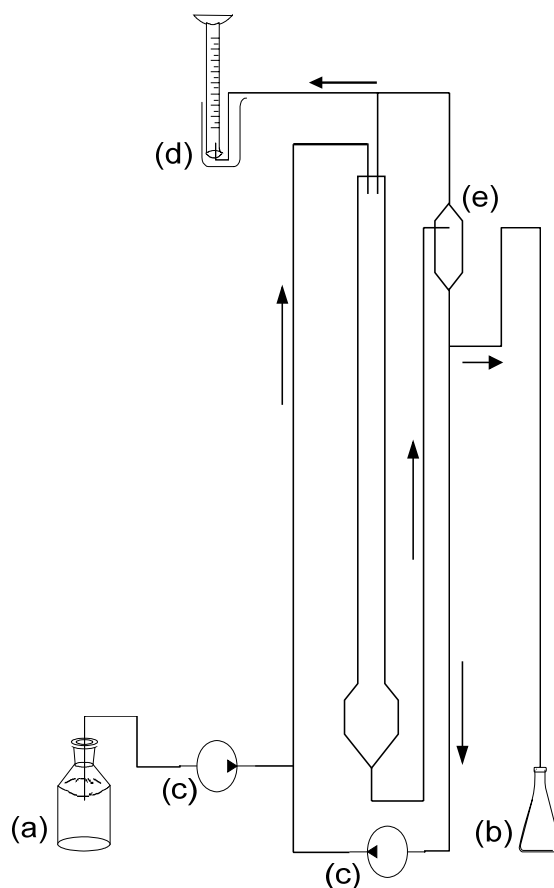


Figura 2.2. Diagrama de la configuración del reactor LFFD. a) influente, b) efluente, c) bomba peristáltica, d) biogás y e) separador de partículas.

Como inóculo se adicionaron 0.025 L de lodo sulfato reductor proveniente del reactor UASB, después se procedió a purgarlo para retirar las burbujas de aire atrapadas en el reactor. El reactor fue operado en lote durante 16 días hasta alcanzar una concentración de biomasa constante de 0.808 ± 0.261 kg de sólidos volátiles inmovilizados (SVI)/m³ de

soporte seco (ver anexo A1) la cual permaneció constante. Durante esta etapa se recambió el medio cada 5 días.

2.1.4 Operación en continuo del reactor LFFD

Cuando la concentración de biomasa fue constante se operó el reactor en continuo. En el quinto día de operación se incrementó la concentración de DQO-sustrato a 2.3 g/L y una DQO/SO₄²⁻ de 2.0 para establecer la relación de aceptor y donador de electrones que se muestra en la ecuación 7. Por lo que la concentración de etanol fue de 24 mmol/L y la del SO₄²⁻ 12 mmol/L (Tabla 2.2).

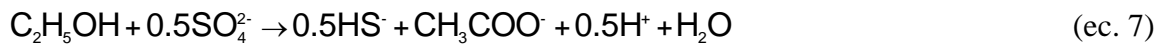


Tabla 2.2. Condiciones de operación del reactor en continuo.

<i>TRH</i> (días)	<i>Q_i</i> (mL/d)	Fuente de carbono	Concentración ($\frac{\text{gDQO-etOH}}{\text{L}}$)	<i>B_v</i> ($\frac{\text{gDQO}}{\text{L-día}}$)	Fuente de azufre	<i>B_vSO₄</i> ($\frac{\text{gSO}_4^{2-}}{\text{L-día}}$)	Relación $\frac{\text{DQO}}{\text{SO}_4^{2-}}$
1	1.8	etanol	2.3g	2.3	Na ₂ SO ₄	1.7	2.0

El reactor se operó con una tasa de recirculación de 190 (ver ecuación 4. RF= 475.2 L/d; F= 2.5 L/d) para lograr un expansión del lecho aproximadamente del 70% de volumen del reactor (1.778 L).

2.1.5 Medio de cultivo.

El medio empleado para todos los reactores fue el propuesto por Visser (1995), variando solo la fuente de carbono y electrones, utilizando sulfato de sodio como aceptor de electrones. La composición de macronutrientes y oligoelementos del medio mineral se muestra en la Tabla 2.3. Se agregó por cada litro de medio 1 mL de la solución de oligoelementos y el pH del medio mineral se ajustó a 6.6 adicionando 0.3 mL de una solución de NaOH 10 N.

Tabla 2.3. Composición del medio mineral propuesto por Visser (1995).

Macronutrientes	mg/L
NH ₄ Cl	280
KH ₂ PO ₄	169
MgCl ₂ 6H ₂ O	150
KCl	500
CaCl ₂	10
Extracto de levadura	18
Solución de oligoelementos	mg/L
FeCl 4H ₂ O	2000
MnCl ₂ 4H ₂ O	785
ZnCl ₂	150
H ₃ BO ₃	50
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	50
EDTA	500
HCl 37%	1 ml/L

2.1.6 Cinéticas de toxicidad

Para evaluar los niveles de toxicidad de los clorofenoles y calcular la concentración que inhibe el 50% del proceso respiratorio (CI₅₀) sulfato reductor, se llevaron a cabo cinéticas en lote. Las pruebas se realizaron por duplicado en botellas serológicas de 60 mL. Se les agregaron 10 mL de soporte con biopelícula inmovilizada proveniente del reactor

fluidizado. Las partículas se lavaron varias veces con una solución fisiológica al 0.9% de NaCl con el fin de eliminar residuos del medio y sustratos. Los lavados se realizaron muy suavemente para evitar el desprendimiento de la biopelícula. Posteriormente a las botellas se les agregaron 25 mL de medio Visser (1995) y se sellaron con tapones forrados de teflón y anillos de aluminio, después se intercambió la atmósfera con una mezcla de N₂:CO₂ (80:20) por 2 minutos para desplazar el aire y establecer condiciones anaerobias. Por último se adicionaron 5 mL de soluciones concentradas que contenían etanol, sulfato y los compuestos tóxicos en concentraciones crecientes (Tabla 2.4). Los compuestos evaluados fueron: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D), 2,4-diclorofenol (2,4DCF), 4-clorofenol (4CF), 2-clorofenol (2CF) y fenol.

Tabla 2.4. Concentraciones utilizadas para cada compuesto ensayado.

compuesto	2,4D	2,4DCF	4CF y 2CF	Fenol
	0.02	0.06	0.19	1.6
	0.04	0.15	0.58	3.19
(mM)	0.11	0.31	1.67	6.37
	0.22	0.46	2.33	12.75
	0.34	0.77	4.66	25.5

Para todas las cinéticas se fijó la concentración de 1.9 gDQO-etanol/L (20 mM etanol) y 0.96 g/L de SO₄²⁻, para mantener una relación de 2 gDQO/gSO₄²⁻. Para los controles se siguió la misma metodología y solo se alimentaron con etanol y sulfato sin los compuestos tóxicos. El proceso respiratorio fue evaluado durante 72 horas, con muestreos cada 12 horas para determinar el etanol y sulfato consumido y la producción de sulfuro y acetato, así como la evolución de la concentración de los compuestos tóxicos durante la cinética. Las muestras fueron analizadas como se describe en el apartado 2.2 de este capítulo.

2.1.7 Operación de los reactores LFFD y UASB con incrementos de concentración de 2CF

Se operó un reactor UASB de vidrio de 6.5 cm de diámetro interno y 30 cm de largo y un volumen de 1.47 L inoculado con 0.5 L de lodo con una concentración de SSV de 39.3 g/L y un reactor LFFD de vidrio con un diámetro interno de 5 cm y una altura de 108 cm de largo, el cual contenía un volumen de 0.7 L de soporte de polietileno de baja densidad con una concentración de 0.4 Kg-SVI/m³ de soporte seco. Ambos reactores se operaron en paralelo con una estrategia de incrementos de concentración de 2CF, formiato y SO₄²⁻ en tres etapas por un periodo de 90 días, los incrementos se realizaron cada 30 días (Tabla 2.5). Para este experimento se cambio la fuente de carbono de acetato a ácido fórmico para garantizar que se metabolizara toda la fuente de carbono a CO₂. Las concentraciones de 2CF y SO₄²⁻ se fijaron en cada etapa. Para ambos reactores se usó una relación DQO_{Total}/SO₄²⁻ de 1.42. La DQO_{Total} fue la suma de la DQO-ácido fórmico más la DQO-2CF. Ambos reactores se operaron a un TRH de 5 días.

Tabla 2.5. Concentraciones de los sustratos y compuestos tóxicos utilizados para los reactores en cada etapa.

Compuesto	Reactor	Etapa		
		1 ^a	2 ^a	3 ^a
2CF [mM]	LFFD	0.19	0.27	0.39
	UASB			
SO ₄ ²⁻ [mM]	LFFD	7.08	10.6	14.1
	UASB			
HCO ₂ H [mM]	LFFD	41.3	62.4	82.6
	UASB			

Los electrones donados del ácido fórmico se calcularon con la ecuación 8 (Rittmann y McCarty, 2001). En donde se puede observar que el ácido fórmico dona 2 equivalentes de electrones (eq e⁻) por cada mol de compuesto.



2.1.8 Arranque y operación de reactores con diferente relación DQO/SO₄²⁻ y concentración constante de 2CF

Se instalaron dos reactores fluidizados (Figura 2.2) de vidrio, los cuales se alimentaron con una relación DQO/SO₄²⁻ de 0.8 y 2.2 (Tabla 2.7), respectivamente. Como inóculo se utilizaron 25 mL de lodo primario para cada reactor proveniente de la planta de tratamiento de aguas residuales de Iztapalapa, el cual contenía una concentración de 20.38 mg SSV/L. En ambos reactores se utilizó soporte limpio acondicionado (ver apartado 2.1.3) antes de introducirlo en el reactor. El volumen de soporte que se agregó a cada reactor fue de 30% con respecto al volumen del reactor. Durante este experimento los reactores se operaron en continuo desde un inicio por un periodo de 98 días, tomando muestras cada tres días para su análisis. Al medio de cultivo alimentado (ver apartado 2.1.4) se le adicionaron las cantidades de 2CF, SO₄²⁻ y HCO₂H indicadas en la Tabla 2.6.

Tabla 2.6. Condiciones de operación y concentraciones de los sustratos utilizados para los reactores a diferente relación DQO/SO₄²⁻.

Parámetro	Reactor LFFD	
	1	2
2CF [mM]	0.39	0.39
gDQO / gSO ₄ ²⁻	0.8	2.2
TRH (d)	5	5
SO ₄ ²⁻ [mM]	10.4	10.4
Q _i (mL/min)	0.277	0.416
RF(L/d)	245.8	472.2
HCO ₂ H [mM]	50.0	136.8

2.2 Métodos de análisis

2.2.1 Toma y almacenamiento de muestras provenientes de los reactores

Se tomaron muestras cada 24 horas del influente y efluente fueron filtradas utilizando filtros con tamaño de poro de 0.45 µm (Pall AP-4498) para retirar material suspendido. Las muestras fueron almacenadas a 4°C para su posterior análisis.

2.2.2 Cuantificación de etanol y acetato

El etanol y acetato se cuantificaron con un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 serie II, de inyección automática con detector de ionización de flama (FID) y las condiciones de análisis fueron las siguientes:

Temperatura del detector: 180°C

Temperatura del inyector: 150°C

Rampa de la columna: de 40 – 170 °C

Columna: AT-1000, longitud 10 m, Ø 0.53 mm

Degradación de clorofenoles por sulfato-reducción en un reactor de lecho fluidizado de flujo descendente (lffd)
Norberto Ulises Garcia Cruz

Gas acarreador: Nitrógeno

Flujo: 6.6 mL/min

Tiempo de corrida: 5 minutos

Volumen de inyección: 0.5 μ L

Se programó una rampa de temperatura, con el fin de mejorar la resolución de los cromatogramas para el etanol y el acetato, iniciando en 80°C con un incremento de 5°C/min, hasta alcanzar 120°C permaneciendo por un minuto a esta temperatura. Las muestras antes de ser analizadas se acidificaron agregando 50 μ L de HCl al 50% a 950 μ L de muestra para obtener un volumen de 1 mL.

Las curvas de calibración se hicieron por triplicado y se calculó el promedio, la desviación estándar, así como los coeficientes de regresión.

2.2.3 Cuantificación de clorofenoles y fenol

La cuantificación del 2,4D, 3,4DCF, 4CF, 2CF y fenol, se hizo por cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC), con un equipo marca WATERS 600 acoplado a un detector WATERS de arreglo de diodos. Se utilizó una columna Econosphere C18 (fase reversa, 250 mm, \varnothing 4.6 mm y tamaño de partícula de 5 μ). La fase móvil utilizada estuvo compuesta por acetonitrilo: amortiguador de acetatos (50:50) (la formulación del buffer de acetatos se muestra en el anexo A3), con un flujo de 1.2 mL/min. Todos los compuestos se detectaron a una longitud de onda de 280 nm.

2.2.4 Cuantificación de ácido fórmico

La cuantificación del fórmico se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Agilent 6890N acoplado a un detector selectivo de masas Agilent 5975B con inyector automático bajo las siguientes condiciones:

Rampa de temperatura: de 40°– 48° C

Columna Capilar: Agilent HP-5MS, longitud 30 m, Ø 250 µm.

Gas acarreador: Helio

Flujo: 1.5 mL/min

Tiempo de corrida: 2.67 minutos

Volumen de inyección: 0.5 µL

Intervalo de masa molecular: 20-150

Las muestras fueron acidificadas antes de analizarlas agregando 50 µL de HCl al 50% a 1450 µL de muestra para obtener 1500 µL de volumen total.

2.2.5 Cuantificación de sulfato (SO_4^{2-})

La cuantificación de sulfato se realizó empleando un método turbidimétrico y por cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC).

Método turbidimétrico: Este método fue reportado por Sheen y col. (1935) y Thomas y Cotton (1954). El cual consiste en precipitar el ion sulfato (SO_4^{2-}) con cloruro de bario en medio ácido. Y posteriormente, medir la absorbancia de la muestra tratada en

espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nm y correlacionar con una curva patrón de NaSO₄ anhidro de 5 – 40 mg/L. La preparación de las soluciones empleadas en esta técnica se encuentran descritas en el anexo A4.

Método cromatográfico: La determinación de SO₄²⁻ se realizó empleando un cromatógrafo de líquidos de alta presión (Waters), equipado con detector de arreglo de diodos (Waters 2996). La columna empleada fue Variant Ionospher 5A de intercambio iónico, con una longitud de 200 mm y un diámetro de 3.0 mm. Se empleó como fase móvil una solución de biftalato de potasio 40 mM, a un flujo de 1.0 mL/min. La fase móvil fue filtrada con membranas de nylon con un diámetro de poro de 0.22 µm.

2.2.6 Cuantificación de carbono inorgánico

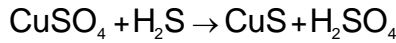
El carbono inorgánico se midió utilizando un equipo SHIMADZU modelo TOC-Vcsn. El cual determina el carbono total y el inorgánico. Se realizaron curvas de calibración para carbono total (CT) y carbono inorgánico (CI). Las soluciones se prepararon de acuerdo al anexo A4.

El equipo detecta primero el carbono total y posteriormente el carbono inorgánico. El COT se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$\text{COT (mg/L)} = [\text{Carbono Total (mg/L)} - \text{Carbono inorgánico (mg/L)}] \quad (\text{ec. 9})$$

2.2.7 Cuantificación de sulfuro disuelto

La cuantificación de sulfuro (S²⁻) disuelto en el efluente se realizó por la técnica reportada por Cord-Ruwisch (1985). El sulfuro disuelto se determina colorimétricamente debido a que este se acompleja con el cobre para formar sulfuro de cobre (color café), como se puede ver en la siguiente reacción:



Los reactivos empleados en esta técnica se describen el anexo A5.

2.2.8 Medición de pH

La medición de pH se realizó en el influente y en la muestra del efluente del reactor, empleando un potenciómetro marca Hanna HI255 equipado con un electrodo de vidrio HI1131.

2.2.9 Cuantificación de sólidos suspendidos volátiles (SSV)

Los sólidos suspendidos volátiles se utilizan como un índice de la concentración de biomasa. Los sólidos suspendidos volátiles se determinaron según los métodos estandarizados para el análisis de agua residual (SMWWA, 1995).

La concentración de sólidos se determinó de la siguiente manera:

$$\text{Sólidos Totales (g/L)} = \left(\frac{\text{Peso de sólidos secos} - \text{Peso del Crisol}}{\text{Volumen de Muestra (L)}} \right) \quad (\text{ec.10})$$

$$\text{Sólidos Fijos (g/L)} = \left(\frac{\text{Peso de sólidos fijos} - \text{Peso del Crisol}}{\text{Volumen de Muestra (L)}} \right) \quad (\text{ec.11})$$

$$\text{Sólidos Volátiles (g/L)} = (\text{Sólidos totales} - \text{Sólidos Fijos}) \quad (\text{ec.12})$$

2.2.10 Cuantificación de biomasa inmovilizada

Primero se pusieron a peso constante filtros Whatman de fibra de vidrio (\emptyset 55 mm y tamaño de poro de 0.45 μm) en charolas de aluminio del mismo diámetro en una mufla a 550 °C por 30 minutos, dejándose enfriar en un desecador a temperatura ambiente, y después registrar el peso.

Los filtros utilizados para filtrar la biomasa se secaron en una estufa a 100 °C durante 1 hora, posteriormente se retiraron de la estufa y se dejaron enfriar en un desecador y se pesaron para así obtener los sólidos totales (ST) de la siguiente manera:

$$ST \text{ (mg)} = A - B$$

Donde:

ST (mg) = miligramos de sólidos totales

A = Peso del filtro + muestra seca

B = Peso del filtro sin muestra

Para calcular los sólidos fijos (SF), después de pesar los filtros se calcinaron en la mufla a 550 °C durante 30 minutos, se enfriaron en un desecador y se pesaron.

$$SF \text{ (mg)} = C - B$$

Donde:

C = Peso del filtro + muestra calcinada

Sólidos volátiles inmovilizados (SVI)

$$SVI \text{ (mg)} = ST - SF$$

La biomasa inmovilizada se reporta como kg de SVI/m³ de soporte seco.

2.2.11 Cuantificación de bióxido de carbono

El bióxido de carbono se cuantificó por cromatografía de gases durante las cinéticas y durante la operación de los reactores utilizando un cromatógrafo Gow-Mac, con una columna de acero empacada. Con las siguientes condiciones de análisis:

Detector de conductividad térmica (TCD)

Temperatura de la columna: 140 °C

Temperatura del detector: 190 °C

Temperatura del inyector: 170 °C

Corriente en el detector: 120 mA

Gas acarreador: Helio

Flujo: 25 mL/min

Empaque de la columna: Carbosphere 80/100, longitud 1.82 m, ϕ 3.2 mm.

Volumen de inyección: 0.1 mL.

Las curvas de calibración se realizaron por triplicado y se calculó el coeficiente de correlación (R^2) utilizando el análisis estadístico de regresión lineal (anexo A4).

2.3 Cálculos

2.3.1 Cálculo del consumo máximo de sulfato

El consumo volumétrico máximo de sulfato (q_{max}) para cada cinética se calculó ajustando los datos obtenidos con el modelo de Gompertz utilizando el programa Origin 7.0 (anexo A6).

2.3.2 Cálculo de la CI_{50} para cada uno de los clorofenoles

Los niveles de toxicidad de los clorofenoles (CI_{50}) en la actividad sulfato reductora se calcularon, graficando la q_{max} obtenida en cada cinética contra las concentraciones utilizadas para cada uno de los compuesto tóxicos (Figura 2.3) utilizando el programa Origin 7.0 (anexo A5).

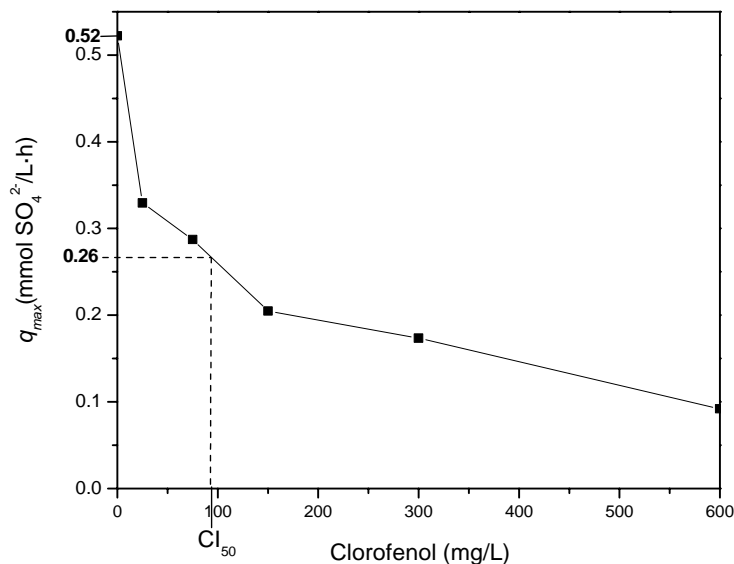


Figura 2.3. Cálculo de la CI_{50} .

2.3.3 Cálculo de la DQO teórica

La DQO teórica para cada compuesto se calculó de acuerdo a la ecuación propuesta por Kleerebezem y Macarie (2003) (Tabla 2.7).

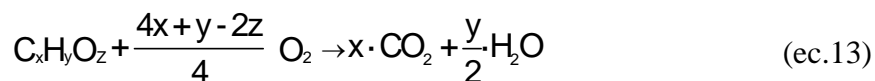
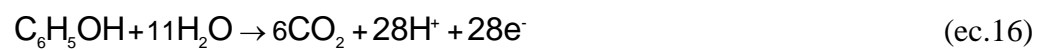
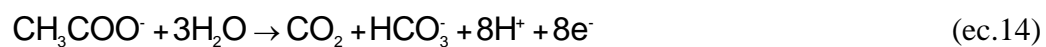


Tabla 2.7. Valor de la DQO teórica para cada compuesto.

Sustrato	DQO teórica
Etanol	2.08 gDQO/gC ₂ H ₅ OH
Formiato	0.35 gDQO/gHCO ₂
Fenol	2.38 gDQO/gC ₆ H ₅ OH

En el caso del consumo del formiato produce 2 eq e⁻ (ec.15) y los eq e⁻ provenientes del 2CF se calcularon a partir del fenol producido estequiométricamente, la completa degradación del fenol hasta CO₂ produce 28 eq e⁻ (ec. 17) (Rittmann y McCarty, 2001).



2.3.4 Análisis estadísticos

El análisis de varianza se determinó mediante el programa NCSS (2002). Ver el anexo A6.

III. Concentraciones inhibitorias de 2,4D y sus posibles intermediarios en una biopelícula sulfato reductora

3.1 Introducción

Los primeros trabajos sobre la toxicidad que ejercen los clorofenoles (monoclorofenoles, diclorofenoles y triclorofenoles), sobre consorcios microbianos de interés ambiental fueron realizados por Blum y Speece (1991 a y b) en donde evaluaron diferentes concentraciones de clorofenoles para calcular la concentración inhibitoria (CI_{50}) en arqueas metanogénicas y bacterias aerobias, observaron que en ambos consorcios el 2,4 DCF ejercía la mayor toxicidad seguido del 2CF y el 4CF. Por otra parte también se ha evaluado la CI_{50} del 2CF y 4CF a partir de la constante de inhibición (K_i) en lodos acidogénicos y metanogénicos, ésta fue calculada con respecto al consumo de acetato y etanol respectivamente, en donde observaron que el 2CF fue más tóxico que el 4CF para ambos tipos de lodo (Jin y Bhattacharya, 1997), resultados similares también fueron reportados por Kim y col. (1994) utilizando un cultivo anaerobio enriquecido con propionato.

En otros estudios se ha observado que la utilización de una fuente alterna de electrones disminuye el efecto tóxico, como pudieron observar Vallecillo y col. (1999) quienes evaluaron la toxicidad del 4CF, 2,4DCF y fenol en un lodo anaerobio con y sin un donador de electrones, encontrando que la adición de acetato favorece la degradación de los clorofenoles.

Por otra parte, se ha reportado que otro de los factores que afecta la toxicidad de los compuestos recalcitrantes sobre la biomasa, es la aclimatación del lodo, como se ha podido observar en estudios llevados a cabo con compuestos aromáticos en lodos anaerobios, en donde encontraron que los lodos previamente adaptados eran menos afectados en la producción de metano por lo que presentaban CI_{50} mayores que los lodos no adaptados

(Olguín-Lora y col. 2003), lo que podría indicar que los lodos adaptados desarrollaron la capacidad de expresar las enzimas capaces de degradar los compuestos recalcitrantes a diferencia de un lodo no adaptado.

Hasta la fecha el único reporte de toxicidad de clorofenoles sobre la sulfato-reducción es la investigación llevada a cabo por Uberoi y Bhattacharya en 1997, estos autores utilizando un lodo enriquecido con propionato y sulfato realizaron experimentos de toxicidad en sistemas en lote con compuestos monoclorados como el 2-clorofenol y el 4-clorofenol, así como varios diclorofenoles entre los que está el 2,4-diclorofenol.

Sierra-Alvarez y Lettinga, (1991) encontraron que en los monoclorados la posición del Cl no influyó en la toxicidad (CI_{50}), ya que no se observó diferencia, sin embargo en los diclorofenoles observaron que la posición en el anillo bencénico incrementa la toxicidad, siendo el 2,4-diclorofenol uno de los más tóxicos seguido del 4CF y el 2CF, este efecto también se ha podido observar en lodos metanogénicos en donde encontraron que la toxicidad se incrementó conforme la molécula de clorofenol contenía mas átomos de Cl.

Por otra parte en la literatura no hay estudios de toxicidad en una biopelícula sulfato reductora. Existen estudios sobre toxicidad en los que se emplean lodos, sedimentos, así como cultivos axénicos. Milner y Goulder (1986) evaluaron la toxicidad del 2- y 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol y el herbicida 2,4D en bacterias aisladas. Los experimentos los llevaron a cabo en agar y la toxicidad la midieron por el efecto de los compuestos en el crecimiento de los microorganismos.

Como se puede ver en los estudios anteriores, el nivel de toxicidad de los clorofenoles sobre los microorganismos puede variar debido a diferentes factores como son el tipo de lodo, la adaptación y la estructura del compuesto, la adición de un co-sustrato, así

como la estrategia aplicada para evaluar la toxicidad, también todos estos parámetros influyen en la detoxificación y degradación de estos compuestos.

Por lo que se requiere de estudios más específicos para conocer el efecto de estos compuestos. En el caso de biopelículas sulfato reductoras, se requiere de mayor investigación sobre la toxicidad de clorofenoles en la misma debido a la importancia para el diseño de tratamientos de aguas residuales que contengan este tipo de compuestos.

El objetivo de esta parte del proyecto, fue evaluar la inhibición del proceso respiratorio de la sulfato-reducción en la presencia del 2,4D y sus posibles intermediarios.

3.2 Resultados

3.2.1 Estudios de inhibición del proceso respiratorio del sulfato

La biopelícula para las cinéticas de inhibición fue cultivada en un reactor LFFD utilizando partículas de polietileno de baja densidad (0.6 mm de diámetro). Cuando se logro una biomasa constante, el reactor se operó en continuo, después de 15 días de operación en continuo el reactor alcanzó el estado estacionario en donde se observo que la reducción de sulfato fue el único proceso respiratorio detectado. El reactor se continuó operando durante un mes. Los resultados de esta etapa se muestran en la Tabla 3.1 y anexo A2.

Tabla 3.1. Consumo de sustratos durante el estado estacionario del reactor LFFD.

	Influyente [mM]	Efluyente [mM]		Recuperación
Azufre	S - SO ₄ ²⁻	S - SO ₄ ²⁻	S - HS ⁻	86.2 %
	11.84 ±0.9	3.83 ±2.3	7.43 ±2.2	
Carbono	C-etOH	C-etOH	C-acetato	84.8%
	54.6 ±2.0	6.78 ±2.4	39.3 ±3.1	

Durante la operación del reactor LFFD para la formación de la biopelícula y las cinéticas de toxicidad se propuso la relación $R_{ace/don}$ (ec. 14) la cual relaciona la cantidad de aceptor y donador de electrones consumidos durante el proceso óxido reductor durante la respiración del sulfato, como una medida para evaluar el efecto de los compuestos fenólicos al proceso sulfato-reductor.

$$R_{acc/don} = \frac{SO_4^{2-} \text{ consumido (mmol)}}{\text{fuente de carbono consumido (mmol)}} \quad (\text{ec. 14})$$

Adicionalmente el efecto tóxico se evaluó a través de la tasa volumétrica de consumo de sulfato (q_{max}) a diferentes concentraciones de los compuestos tóxicos como se describe en el apartado 2.1.6 del capítulo de materiales y métodos.

El reactor LFFD alcanzó en el estado estacionario una q_{max} entre 0.52 a 0.66 mmol $SO_4^{2-}/L \cdot d$ y de 0.8 mmol etanol/ $L \cdot d$, mientras la $R_{ace/don}$ fue entre 0.58 y 0.75, con una eficiencia en la sulfato-reducción del $67 \pm 3.2\%$, un consumo de etanol del 87.6 % indicando una estabilidad en la sulfato-reducción de la biopelícula.

Por otra parte en la Tabla 3.2 se muestran las velocidades volumétricas de consumo de sulfato q_{max} (mmol $SO_4^{2-}/L \cdot d$) y la $R_{ace/don}$ para las diferentes concentraciones utilizadas de los cinco compuestos fenólicos ensayados: 2,4D, 2,4DCF, 4CF, 2CF y fenol durante las cinéticas de inhibición. De acuerdo a los valores de la CI_{50} (Tabla 3.3), el 2,4DCF fue el más inhibitorio sobre el proceso de sulfato-reducción (CI_{50} de 0.106 mM) mientras que la CI_{50} del 2CF y el 4CF fue de 0.78 y 0.84 mM respectivamente, siendo el fenol el menos inhibitorio con una CI_{50} de 152.3 mM. En general, se observó que la adición de los compuestos clorofenólicos produjo diferentes grados de inhibición sobre el consumo de

III. Concentraciones inhibitorias de 2,4D y sus posibles intermediarios

sulfato conforme la concentración del tóxico se incrementaba, disminuyendo la velocidad volumétrica de consumo del SO_4^{2-} .

Tabla 3.2. Velocidad volumétrica de sulfato-reducción y relación aceptor-donador.

2,4DCF			2,4D			2CF			4CF		Fenol		
mM	q_{max}	$R_{ace/don}$	mM	q_{max}	$R_{ace/don}$	mM	q_{max}	$R_{ace/don}$	q_{max}	$R_{ace/don}$	mM	q_{max}	$R_{ace/don}$
0	0.66	0.75	0	0.52	0.58	0	0.52	0.58	0.66	0.75	0	0.66	0.75
0.06	0.44	0.72	0.02	0.38	0.59	0.19	0.32	0.63	0.55	0.71	1.6	0.32	0.45
0.15	0.22	0.62	0.04	0.3	0.54	0.58	0.28	0.63	0.48	0.65	3.19	0.27	0.38
0.31	0.21	0.52	0.11	0.28	0.5	1.67	0.20	0.51	0.17	0.54	6.37	0.24	0.47
0.46	0.21	0.54	0.22	0.18	0.48	2.33	0.17	0.43	0.12	0.52	12.75	0.24	0.46
0.77	0.16	0.47	0.34	0.12	0.46	4.66	0.09	0.17	0	0	25.5	0.11	0.49

Tabla 3.3. Valores de la CI_{50} de los compuestos fenólicos ensayados.

Compuesto	CI_{50} (mM)
2,4DCF	0.11
2,4D	0.13
2CF	0.78
4CF	0.84
fenol	1.53

Con respecto a la $R_{ace/don}$, (Tabla 3.2) se observó que el valor fue menor en presencia de los compuestos fenólicos, indicando que el transporte de electrones del donador (etanol) al aceptor (sulfato) fue afectado, probablemente el proceso respiratorio se interrumpió a nivel de membrana. Lo anterior se basa en la explicación propuesta por Sikkema y col.

(1995) debido a que encontraron que este tipo de moléculas se pueden disolver en la membrana celular afectando el flujo de iones potasio y las proteínas lipídicas.

Durante el tiempo de exposición (72 horas) de las pruebas no se observó deshalogenación de los clorefenoles así como tampoco del herbicida 2,4D debido a que no se detectó la acumulación de fenol o benzoato a pesar de que se adicionó una fuente de electrones (etanol) y de que se establecieron condiciones reductoras ya que se detectó la producción de sulfuro por la biopelícula no adaptada. Esto sugiere que no se estableció una competencia por captar los electrones donados por el etanol entre los aceptores de electrones, el sulfato y los clorofenoles, de tal forma que se promoviera la deshalogenación como se ha observado en otros estudios (Ensley y Suflita, 1995), la deshalogenación no se llevó a cabo en este estudio probablemente debido que la biopelícula no había sido expuesta con anterioridad a compuestos clorados, por lo que probablemente los microorganismos no produjeron enzimas deshalogenasas. El efecto inhibitorio pudo afectar el transporte de electrones, así como en el proceso respiratorio del sulfato.

3.2.2 Efecto inhibitorio de diclorofenoles

En la Figura 3.1, se muestra el perfil de consumo del sulfato y el etanol cuando la biopelícula estuvo en contacto con el 2,4DCF, este compuesto presentó la mayor inhibición sobre la sulfato-reducción en la biopelícula, la velocidad volumétrica del consumo de sulfato disminuyó de 0.44 a 0.16 mmol SO_4^{2-} /L·h y la velocidad volumétrica de consumo de etanol de 0.3 a 0.22 mmol etanol/L·h cuando se incrementó la concentración del compuesto tóxico de 0.06 a 0.77 mM.

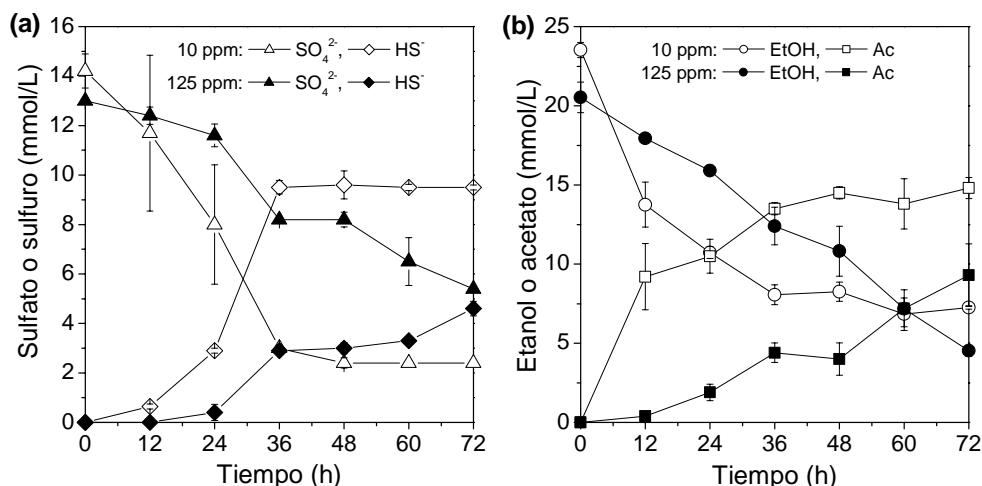


Figura 3.1. Perfiles de la degradación de (a) sulfato y (b) etanol en presencia de 2,4DCF a 0.06 y 0.77 mM. EtOH: etanol; Ac: acetato; HS⁻: sulfuro; SO₄²⁻: sulfato.

El 2,4D ejerció un efecto similar sobre el consumo de sulfato y de etanol al observado con el 2,4DCF como se muestra en la Figura 3.2. En el caso del herbicida no se observó la hidrólisis del enlace fenoxi, debido a que no se detectó el 2,4DCF que es el producto intermediario de esta reacción, la cual es el paso inicial en su degradación como fue reportado por Gibson y Suflita (1993).

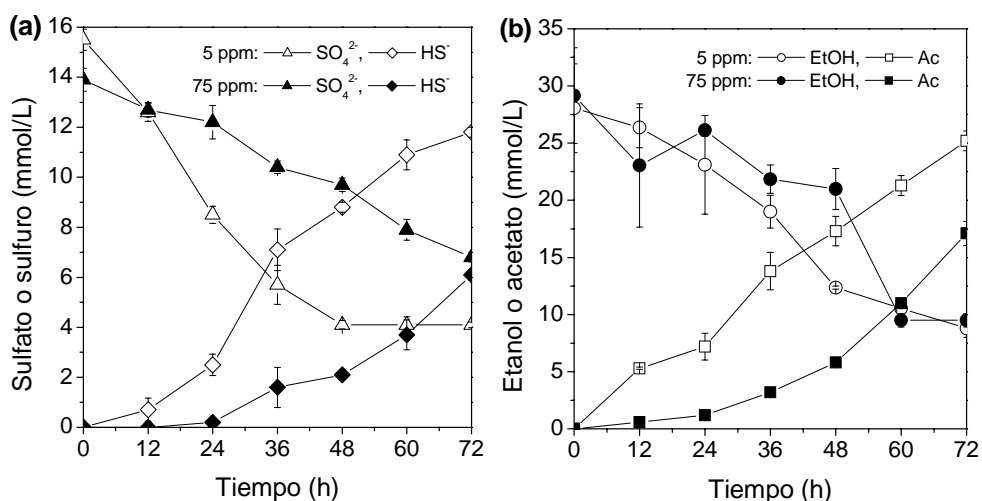


Figura 3.2. Perfiles de la degradación de (a) sulfato y (b) etanol en presencia de 2,4D a 0.02 y 0.34 mM. EtOH: etanol; Ac: acetato; HS⁻: sulfuro; SO₄²⁻: sulfato.

El valor de q_{max} disminuyó en un 77% a 0.34 mM de 2,4D con respecto al control (sin la adición de 2,4D), mientras que la $R_{acc/don}$ disminuyó en un 20%. Del mismo modo para el caso del 2,4DCF la $R_{acc/don}$ disminuyó en un 28% a la misma concentración (Tabla 3.2), lo que indicó que el 2,4D y el 2,4DCF tuvieron un efecto inhibitorio menor en el consumo del donador de electrones (Figura 3.1b y 3.2b) y mayor con respecto al consumo de sulfato en la biopelícula (Figura 3.1a y 3.2a), observándose una CI_{50} de 0.13 mM para el 2,4D. Estos resultados, concuerdan por lo reportado por DeLorenzo y col. (2001) quienes reportaron la toxicidad del 2,4D y su intermediario 2,4DCF en *Vibrio fisheri* y microalgas, observando que el 2,4DCF fue más inhibitorio que el 2,4D.

En la actualidad hay pocos reportes sobre niveles de toxicidad o inhibición de clorofenoles bajo sulfato-reducción, la mayoría de los estudios solo reportan degradación de estos compuestos.

3.2.3 Efecto inhibitorio de monoclorofenoles

Los perfiles de consumo de sulfato y etanol, así como la producción de sulfuro y acetato a 0.19 y 4.66 mM que fueron las concentración mínima y máxima evaluadas para el 2CF y el 4CF se muestran en la Figura 3.3.

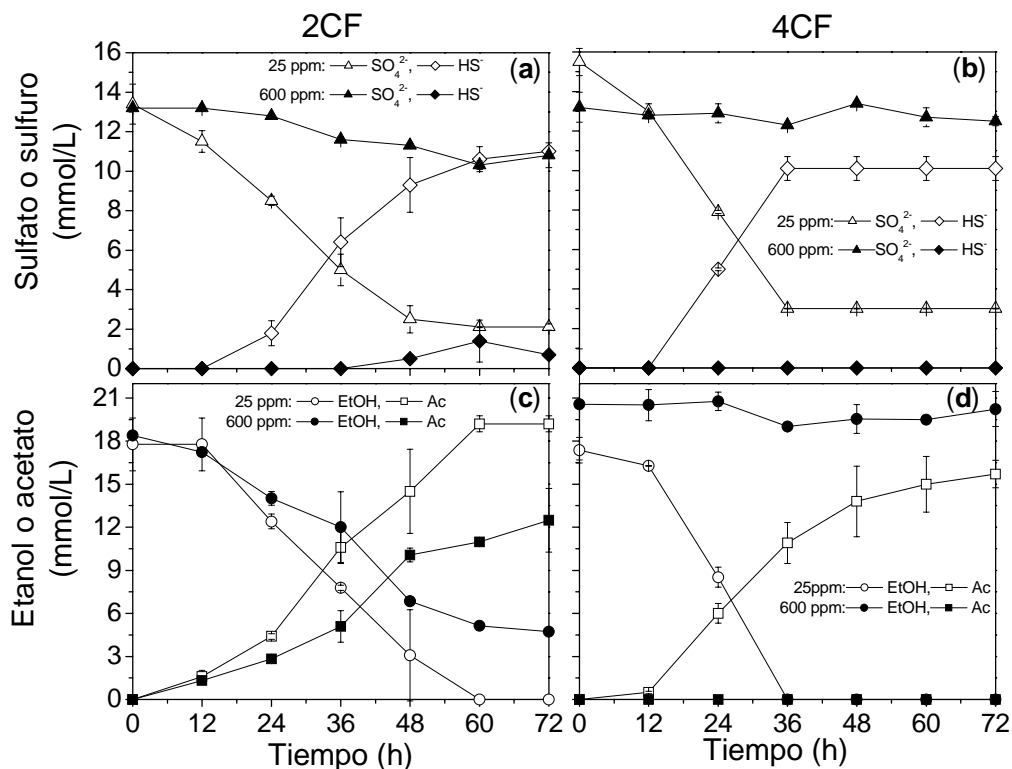


Figura 3.3. Degradación de sulfato (a y b) y etanol (c y d) en presencia de 2-clorofenol (columna derecha) y 4-clorofenol (columna izquierda) a 0.19 y 4.66 ppm. EtOH: etanol; Ac: acetato; HS⁻: sulfuro; SO₄²⁻: sulfato.

Ambos fenoles monocloraos tuvieron un efecto similar de toxicidad sobre la sulfato-reducción (Figura 3.3 a y b). Se encontró que para la más alta concentración evaluada (4.66 mM) del 4CF se produjo la máxima toxicidad y se inhibió totalmente el proceso respiratorio (la sulfato-reducción y el consumo de etanol). A 1.67 mM de 4CF, la q_{max} de sulfato-reducción fue similar a la q_{max} del 2CF a 2.33 mM (Tabla 3.2). En estas concentraciones la sulfato-reducción disminuyó 74% y 67% para el 4CF y el 2CF, respectivamente.

Se observó que a 4.66 ppm, hubo una disminución de 82% en la velocidad volumétrica de consumo del sulfato (q_{max}) mientras que la $R_{ace/don}$ disminuyó 70%, por lo

que la sulfato-reducción fue inhibida casi en su totalidad (Figura 3.3a). En comparación con el 4CF a la misma concentración la sulfato-reducción y el consumo de etanol fueron inhibidos en su totalidad (Figura 3.3 b y d), lo que indica que la posición *para*- tiene un efecto más inhibitorio en el proceso respiratorio de acuerdo a los valores de la q_{max} y $R_{ace/don}$ (Tabla 3.2). Estos resultados son similares a lo reportado en la literatura para consorcios metanogénicos en donde la posición *para*- presentó una mayor toxicidad (Ennik-Marsen y col. 1998).

3.2.4 Valores de CI_{50} y su relación con la estructura molecular

De todos los compuestos evaluados el fenol fue el que presentó la menor toxicidad, ya que a una concentración de 25.5 mM la q_{max} de la sulfato-reducción decreció 83% con respecto al control (Tabla 3.1), mientras que la $R_{ace/don}$ solo se redujo 34% lo que indicó que el proceso respiratorio no fue inhibido completamente. La CI_{50} fue de 1.53 mM y el fenol no fue oxidado ni mineralizado durante la duración de las cinéticas.

De acuerdo a los valores de CI_{50} para cada uno de los compuestos evaluados, se encontró que la toxicidad se incrementó de acuerdo al número de átomos de cloro presentes en la molécula, como se puede observar en la Figura 3.4.

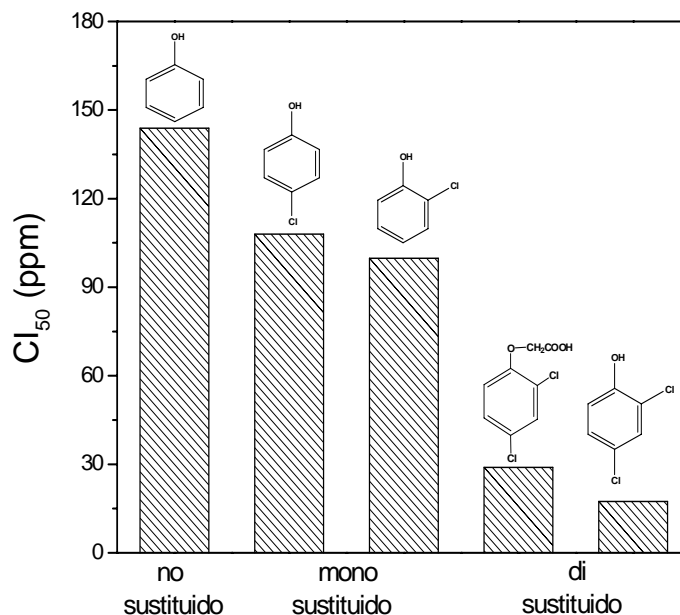


Figura 3.4. Valores obtenidos para los clorofenoles y el fenol.

De acuerdo a los valores de la CI_{50} (Tabla 2.3) para los fenoles clorados, se observó una relación entre el número de átomos de Cl y su posición con respecto a la toxicidad ejercida en la biopelícula siendo el 2,4D y el 2,4DCF los compuestos más tóxicos como se puede observar en la Figura 3.4, con una CI_{50} de 0.11 y 0.13 mM respectivamente, estos valores en comparación con la toxicidad de los monoclorofenoles fueron 6 veces más bajas, debido a que la CI_{50} para el 2CF y 4CF fue cercana a 0.77 mM. También se observó con respecto a los valores de q_{max} que el 2,4D y 2,4DCF tuvieron una velocidad de consumo de sulfato a 0.34 y 0.46 mM respectivamente, similar a la de los monoclorados a una concentración de 2.33 mM (Tabla 1.3). Los valores de la CI_{50} indicaron que la mayor inhibición en la biopelícula sulfato reductora fue observada para el 2,4DCF seguida de 2,4D>2CF>4CF y fenol. Resultados similares fueron reportados por Uberoi y Bhattacharya (1997), quienes evaluaron la toxicidad de varios clorofenoles en un lodo sulfato reductor utilizando propionato como fuente de electrones, en donde observaron que el 2,4DCF fue

más inhibitorio que el 2CF y 4CF, sin embargo encontraron en el caso de los monoclorados que el 4CF fue más toxico que el 2CF.

Por otra parte se observó una relación entre la CI_{50} y el coeficiente de partición K_{ow} de los clorofenoles evaluados en este estudio, como se muestra en la Figura 3.5.

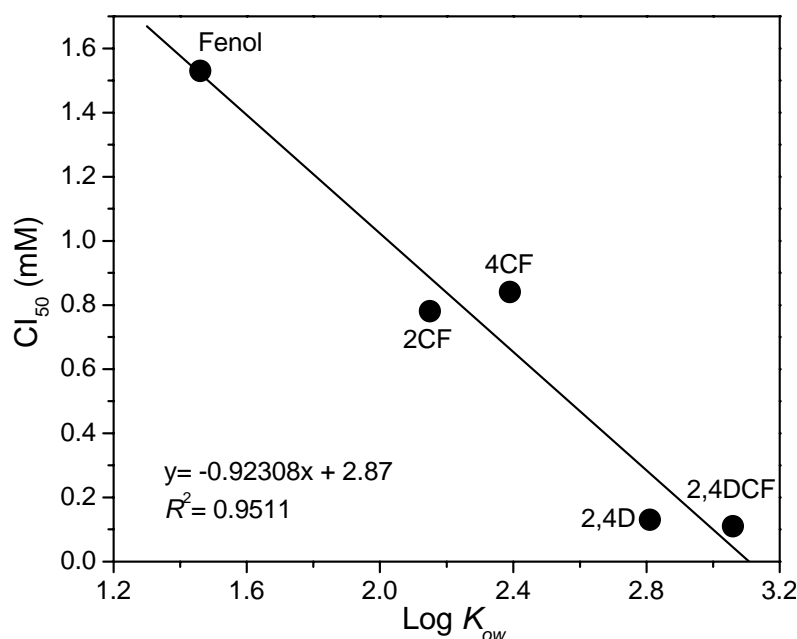


Figura 3.5. Relación entre el K_{ow} y la CI_{50} observada para el 2,4D y sus intermediarios.

En donde se puede observar que conforme se incrementa la hidrofobicidad del compuesto, aumenta la toxicidad. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Sikkema y col. (1995) en donde observaron que los hidrocarburos con un mayor índice K_{ow} producían una mayor toxicidad en los microorganismos. Este efecto tóxico se podría deber a que las moléculas con mayor hidrofobicidad tienden a disolverse con mayor facilidad en la membrana celular afectando el transporte de electrones y otros procesos metabólicos que se llevan a cabo a este nivel (Sikkema y col. 1995).

Por otra parte en este estudio también se observó que los clorofenoles pueden afectar o desestabilizar la sulfato-reducción, así como la transferencia de electrones debido a que solo se afectó el consumo de sulfato y no de etanol el cual fue consumido casi en su totalidad en todos los ensayos excepto con el 4CF a 4.66 mM.

La falta de degradación y de mineralización de los compuestos fenólicos se pudo deber a la ausencia de las enzimas responsables de la deshalogenación y degradación del fenol las cuales son enzimas inducibles como lo han señalado Holliger y col. (2003) y otros autores, ya que se ha observado que cultivos microbianos que estuvieron en contacto con clorofenoles por largos periodos de tiempo fueron capaces de degradarlos en comparación con cultivos no adaptados. En un estudio llevado a cabo con un consorcio microbiano sulfato reductor proveniente de sedimento marino se observó la deshalogenación y degradación de 2-clorofenol, 3-clorofenol y 4-clorofenol después de 5 años de exposición a los compuestos tóxicos (Bossert y col. 2003).

3.3 Conclusiones

Los clorofenoles afectan el proceso respiratorio del sulfato en la biopelícula, inhibiendo la sulfato-reducción y el consumo de etanol. Los fenoles clorados no fueron degradados por la biopelícula inmovilizada con etanol, ni en concentraciones bajas (5 ppm de 2,4D), a pesar de que se adicionó un donador alternativo de electrones. El fenol fue el compuesto que produjo el menor efecto inhibitorio, lo que indicó que los átomos de Cl en la molécula, así como su número en la complejidad de la molécula incrementan los niveles de toxicidad. Con respecto al índice CI_{50} el nivel de toxicidad fue 2,4DCF > 2,4D > 2CF > 4CF > fenol.

IV. Capacidad de degradación de 2-clorofenol en una biopelícula sulfato reductora y un lodo floculento con incrementos de concentración

4.1 Introducción

El 2CF se encuentra entre los monoclorados con mayor espectro de aplicaciones a nivel industrial debido a que se utiliza para la fabricación de herbicidas y desinfectantes, entre otros usos, por tal motivo se ha detectado en el ambiente, principalmente en ecosistemas acuáticos y terrestres (Stringer y Johnston, 2001), por otra parte también se ha encontrado que se produce por reacción química durante la potabilización del agua con hipoclorito y durante los incendios forestales (Czaplicka, 2004). Por lo tanto es motivo de preocupación ambiental debido a que es un compuesto tóxico a los seres vivos.

En condiciones anaerobias, los compuestos fenólicos halogenados como el 2CF son reducidos biológicamente con el consumo de dos electrones provenientes de un donador de electrones, esta reacción es llevada a cabo por enzimas deshalogenasas, que debido a las características de sus sitios activos son capaces de transportar electrones al anillo aromático (van Peé y Unversucht, 2003), produciendo fenol el cual es metabolizado hasta acetato, bajo condiciones de sulfato-reducción a través de la ruta metabólica de la Benzoil-CoA (Harwood y col, 1999). Cuando el proceso respiratorio de la deshalogenación reductiva está acoplado a la generación de energía por el metabolismo microbiano se le conoce como halorespiración (Beaudette y col. 2002)

Se ha reportado que la presencia de sulfato puede provocar una competencia por los electrones donados entre los sulfoaniones producidos (aceptores de electrones) y los compuestos clorados aromáticos que actúan como aceptores alternos de electrones, de tal manera que el proceso sulfato reductor puede llevarse a cabo lentamente, y se puede favorecer la deshalogenación y la sulfato-reducción con la adición de donadores de

electrones como son el ácido láctico, ácido fórmico, acetato, piruvato, etanol, glucosa e H₂ (Ensley y Suflita, 1995).

En la actualidad existen reportes de la degradación de compuestos aromáticos halogenados bajo condiciones de sulfato-reducción (Hägglom, 1998, Hägglom y col. 2000). Chang y col. (2004) evaluaron la degradación del 2CF en una biopelícula sulfato reductora alimentada con H₂ como fuente de electrones y el clorofenol como fuente de carbono en un reactor en continuo, observaron eficiencias de remoción del 80% de 2CF acoplada a la sulfato-reducción.

La degradación anaerobia de clorofenoles, así como de otros compuestos halogenados es posible gracias a que los microorganismos son capaces de acoplar la deshalogenación reductiva con la conservación de energía, a este proceso se le llama deshalorespiración, y está considerado como una reacción bioquímica ambientalmente importante llevada a cabo por las bacterias anaerobias capaces de transformar o degradar este tipo de compuestos (Holliger y col. 1999). Actualmente se han aislado bacterias sulfato reductoras capaces de acoplar la degradación de compuestos monoclorados y el consumo de sulfato como *Desulfomonile tiedjei*, cepa 2CB-1 y *Desulfovibrio dechloroacetivorans* SF3, entre otras, mientras que bacterias del género *Desulfitobacterium* spp. son capaces de degradar mono, tri y pentaclorofenoles usando sulfito como aceptor terminal de electrones (Sun y col. 2000; Löffler y col. 2003).

Para lograr que se lleve a cabo este proceso se necesita de una aclimatación del inóculo la cual puede variar desde 50 días hasta 200 días, se ha observado que durante este tiempo de contacto con los compuestos tóxicos, las bacterias son capaces de expresar los genes que codifican las enzimas deshalogenasas que les permiten metabolizar los

compuestos (Heider y Rabus, 2008). Por lo que se requiere de nuevas estrategias para reducir el tiempo de aclimatación y así acortar los tiempos de degradación.

Durante esta parte del proyecto y con base en los ensayos de toxicidad se decidió alimentar el 2CF como compuesto tóxico debido a que no es una molécula compleja, además de que no causa inhibición en el consumo de sulfato a bajas concentraciones, por otra parte se utilizó un reactor LFFD debido a que por sus características hidrodinámicas tiene una mejor agitación y mezcla y presenta menos zonas muertas comparado con otros reactores como es el UASB, además la recirculación ayuda a diluir la concentración del compuesto tóxico.

En este ensayo se utilizó una estrategia con incrementos de concentración de 2CF, así como de SO_4^{2-} y ácido fórmico como se describe en el apartado 2.1.7 de materiales y métodos, para favorecer la aclimatación al 2CF de una biopelícula en un reactor LFFD y se comparó con un reactor UASB inoculado con lodo floculento. Durante éste experimento se sustituyó el etanol por ácido fórmico para garantizar que la fuente de carbono se mineralice por completo hasta CO_2 y done los electrones necesarios para la sulfato-reducción, ya que como se observó en las cinéticas de toxicidad, el etanol solo fue mineralizado a acetato afectando la producción de electrones.

4.2 Resultados

4.2.1 Operación en continuo del reactor LFFD

El reactor fue operado en continuo por un periodo de 90 días, utilizando una estrategia de incrementos de carga como se describe en la Tabla 4.1. Cada etapa tuvo una duración aproximada de 30 días. En el reactor UASB se incrementó la concentración de

SO₄²⁻ y de HCO₂H en el influente, considerando la concentración de biomasa en el reactor, la cual fue mayor que en el reactor LFFD.

Tabla 4.1. Concentraciones de los sustratos y 2CF para los reactores en cada etapa.

Compuesto	Reactor	Etapa		
		1 ^a	2 ^a	3 ^a
2CF [mM]	LFFD	0.19	0.27	0.39
	UASB			
SO ₄ ²⁻ [mM]	LFFD	5.2	7.8	10.4
	UASB	7.08	10.6	14.1
HCO ₂ H [mM]	LFFD	41.3	62.4	82.6
	UASB	58.0	87.5	115.0

Como se puede ver en la Figura 4.1a, durante la primera etapa el reactor LFFD se alimentó con una concentración de 0.19 mM de 2CF, y se observó un consumo promedio de 0.06 ±0.02 mM de 2CF, por otra parte durante los primeros 7 días de operación se observó la formación de fenol alcanzando una concentración máxima de 0.055 mM (Figura 4.2a).

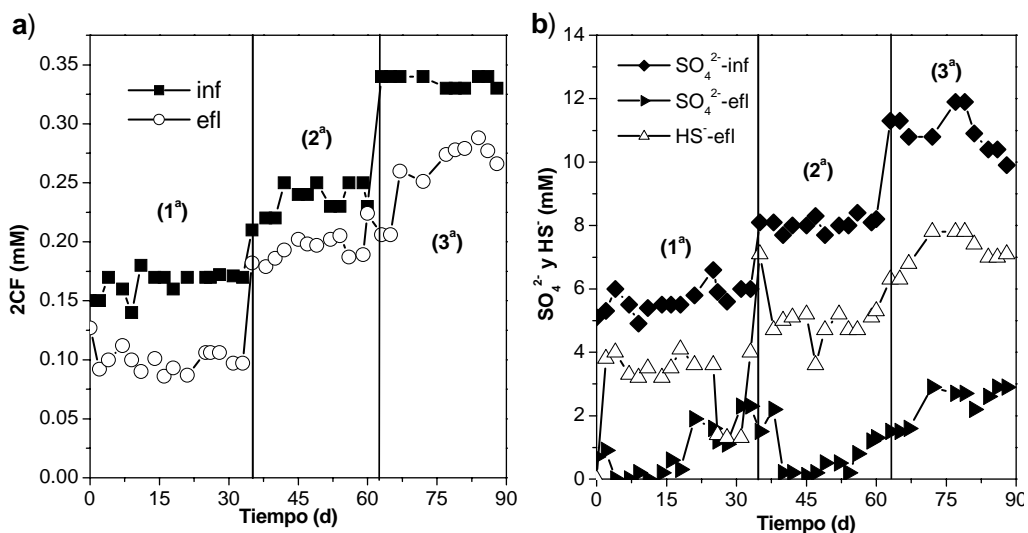


Figura 4.1. Perfil de 2CF (a) y sulfato y sulfuro (b) durante la operación en continuo del reactor LFFD con incrementos de 2CF, SO_4^{2-} y formiato.

La producción de fenol fue evidencia de la deshalogenación del 2CF como se ha reportado (Field y Sierra-Alvarez, 2008). Al mismo tiempo se detectó acetato (0.2 mM) el cual fue degradado junto con el fenol en los siguientes 10 días de operación (Figura 4.2a).

Durante la 2^a y 3^a etapa se incrementó la concentración de 2CF (Tabla 4.1), la concentración real promedio cuantificada a la entrada fue de 0.24 ± 0.01 y 0.34 ± 0.01 mM, respectivamente. Se observó un consumo de 0.04 ± 0.02 y 0.08 ± 0.03 mM de 2CF correspondiente a una eficiencia de consumo de 17.9 y 23% para la segunda y tercera etapa. Se observó una disminución en la eficiencia de consumo del 2CF, al comparar dichas eficiencias con la que se obtuvo en la primera etapa (39%). Lo anterior apunta a que pudo existir un efecto inhibitorio causado por el rápido incremento en la concentración del 2CF, ya que cada etapa fue de 30 días lo que no permitió la adaptación de la biopelícula al compuesto, está reportado que se requieren periodos mayores a 50 días para alcanzar un 80% de consumo de 2CF (Chan y col. 2004; Häggblom y col. 1993). En estas etapas no se

detectó fenol o acetato (Figura 4.2 a) y se observó una velocidad específica de consumo de 2CF de 0.019 mM/(gSVI·d) en promedio de las 3 etapas.

Con respecto al SO_4^{2-} , a la mitad de la primera etapa se observó una disminución en el consumo del sulfato del 94% en los primeros 18 días al 71% (Figura 4.1b, Tabla 4.2) durante esta etapa se observó en promedio un consumo de sulfato del 84% (4.76 ± 0.7 mM) y una velocidad volumétrica (q) de $0.9 \text{ mmol-SO}_4^{2-}/\text{L}\cdot\text{d}$. Posteriormente en la 2ª etapa el consumo de sulfato alcanzó un 90% (7.3 ± 0.6 mM) decayendo para la última etapa hasta 78% (8.59 ± 1.0 mM). Esto se pudo deber al efecto tóxico del 2CF en el consumo de sulfato como se ha reportado anteriormente en donde se ha observado que conforme se incrementa la concentración de 2CF la actividad sulfato reductora va disminuyendo y a una concentración de 0.77 mM la actividad sulfato reductora se inhibe 50% (García-Cruz y col. 2010), sin embargo se observó que la velocidad de utilización de sulfato se incrementó en 1.46 y 1.72 $\text{mmol-SO}_4^{2-}/\text{L}\cdot\text{d}$ para la 2ª y 3ª etapa, respectivamente. Esto se debió al incremento en las concentraciones de sulfato para cada etapa. Un efecto similar también se observó en la formación de HS^- , debido a que la concentración se incrementó en cada etapa siendo de 3.1 ± 1.3 mM para la primera etapa y de 5.0 ± 0.8 y 7.1 ± 0.6 mM para la segunda y tercera etapa, respectivamente (Figura 4.1 b).

En contraste con el sulfato, el 2CF no afectó al donador de electrones ya que el formiato se consumió totalmente durante las tres etapas y fue mineralizado hasta HCO_3^- , recuperándose aproximadamente el 100% del carbono alimentado como ácido fórmico (Figura 4.2, Tabla 4.3) y durante el tiempo de operación no se detectó CO_2 debido a que el pH del reactor se mantuvo en 9.2. Por lo que el efecto del 2CF en el consumo de sulfato se pudo deber a la interacción del clorofenol con la membrana celular y por lo tanto afectar el

consumo de sulfato o el flujo de electrones (Sikkema y col. 1995). Se observó que el reactor alcanzó un potencial oxido-reductor (E°) de -143.0 mV (Figura 4.3) lo que indicó que se encontraba en condiciones de sulfato-reducción (Lovley y col. 1994). El balance de azufre indicó una pérdida aproximada de 15% (Tabla 4.2) durante los 90 días de operación la cual se pudo deber a la formación de S^0 en la parte superior del reactor debido a la presencia de aire, el cual reaccionó con el HS^- producido (Steudel, 2000), dicho azufre elemental no fue cuantificado durante el tiempo de experimentación.

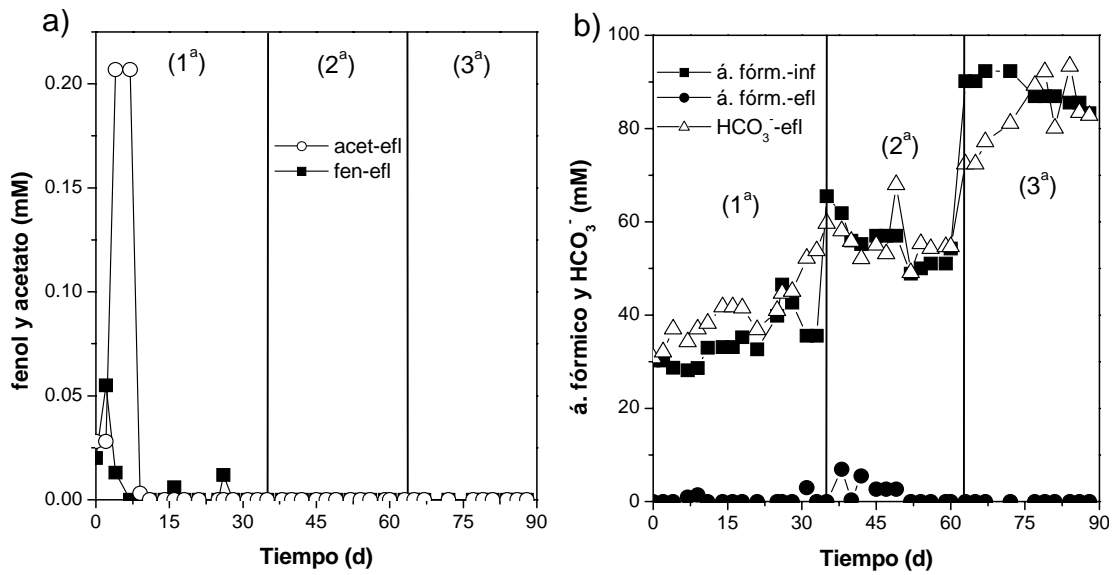


Figura 4.2. Formación de acetato y fenol (a) y consumo de ácido fórmico (b) durante la operación del reactor LFFD.

Tabla 4.2. Balance de azufre para los reactores LFFD y UASB en las tres etapas.

Etapa	Reactor	Influente (mM)	Efluente (mM)		Recuperado (%)
		S-SO ₄ ²⁻	S-SO ₄ ²⁻	S-HS ⁻	
1 ^a	LFFD	5.7 ± 0.4	0.89 ± 0.8	2.9 ± 1.3	66.9 ± 17.9
	UASB	7.2 ± 0.6	5.30 ± 1.4	1.78 ± 0.8	97.2 ± 9.6
2 ^a	LFFD	8.0 ± 0.2	0.74 ± 0.7	5.0 ± 0.8	71.8 ± 15.0
	UASB	10.5 ± 0.8	2.76 ± 1.0	6.63 ± 1.3	88.8 ± 11.9
3 ^a	LFFD	10.9 ± 0.7	2.3 ± 0.6	7.1 ± 0.6	86.7 ± 11.5
	UASB	14.9 ± 0.9	6.66 ± 1.0	6.04 ± 1.3	85.4 ± 11.0

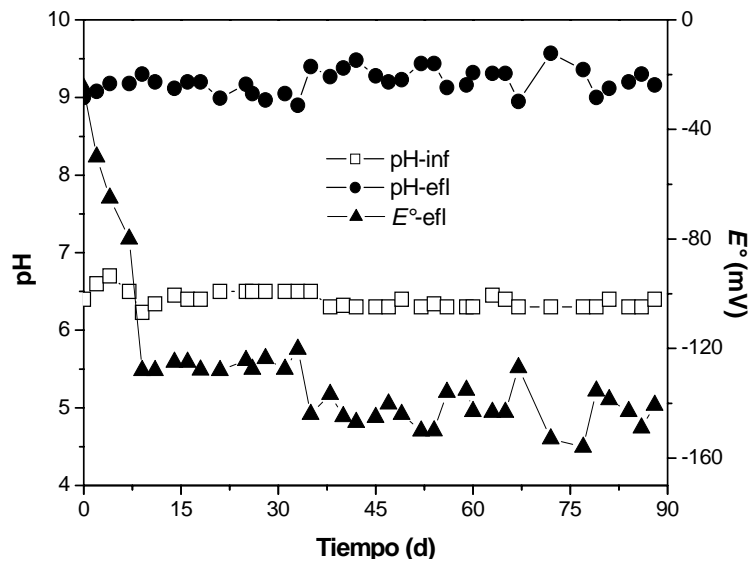


Figura 4.3. Perfil de pH y E° en el reactor LFFD durante los incrementos de carga.

Tabla 4.3. Balance de carbono para los reactores LFFD y UASB durante las tres etapas.

Etapa	Reactor	Influente	Efluente (mM)		Recuperado (%)
		(mM)	C-HCOO ⁻	C-HCO ₃ ⁻	
1 ^a	LFFD	34.2 ±5.3	0.36 ±0.83	40.5 ± 6.6	119.5 ±17.5
	UASB	52.5 ±3.1	0	53.9 ±17.3	102.1 ±16.3
2 ^a	LFFD	55.4 ±4.9	1.7 ± 2.4	55.8 ± 4.7	103.9 ±8.0
	UASB	82.4 ±5.1	1.1 ±2.1	80.7 ±4.7	99.3 ±7.5
3 ^a	LFFD	88.0 ±3.1	0	82.4 ±7.5	93.6 ±10.6
	UASB	115.5 ±5.5	3.31 ±3.9	112.3 ±6.2	100.1 ±9.2

Nota: no se consideró en la tabla el carbono proveniente del 2CF consumido debido a que fue menor a la desviación estándar en cada etapa (LFFD: 1^a 0.39, 2^a 0.26, 3^a 0.46 mM; UASB: 1^a 0.55, 2^a 0.26, 3^a 0.46 mM de carbono).

4.2.2 Operación en continuo del reactor UASB

El reactor UASB se operó bajo las mismas condiciones que el reactor LFFD (Tabla 4.1). Durante la primera etapa el reactor alcanzó una degradación de 2CF de 50% (Figura 4.4a), en la cual consumió 0.09 ± 0.035 mM, ésta fue la mayor concentración consumida que se observó durante los 90 días de operación del reactor, ya que en la segunda etapa sólo se consumió 21% (0.6 ± 0.02 mM) y decayó durante la 3^a etapa hasta 14% en donde se observó un consumo de 0.5 ± 0.02 mM. Lo que indicó que el lodo perdió la capacidad de consumo del 2CF conforme se incrementó la concentración del mismo, esto se pudo deber posiblemente a un efecto inhibitorio causado por el 2CF sobre las bacterias que llevaron a cabo la deshalogenación. Resultados similares fueron reportados por Ye y Shen (2004) al alimentar diferentes clorofenoles (2CF, 3CF y 4CF) en un reactor, observaron que al incrementar la concentración de clorofenol, el lodo disminuyó la capacidad de degradar el compuesto y no se adaptó después de 100 días de alimentación. La degradación del 2CF

siguió la ruta metabólica de la deshalogenación reductiva debido a que durante los primeros 20 días de operación se detectó fenol (Harwood y col, 1999), alcanzando una máxima concentración de 0.05 mM en el día 2, también se detectó acetato (0.4 mM) durante este periodo de tiempo (Figura 4.5). Al final del tiempo de operación se observó una velocidad específica promedio de consumo de 2CF de 0.0007 mM/(gSSV·d).

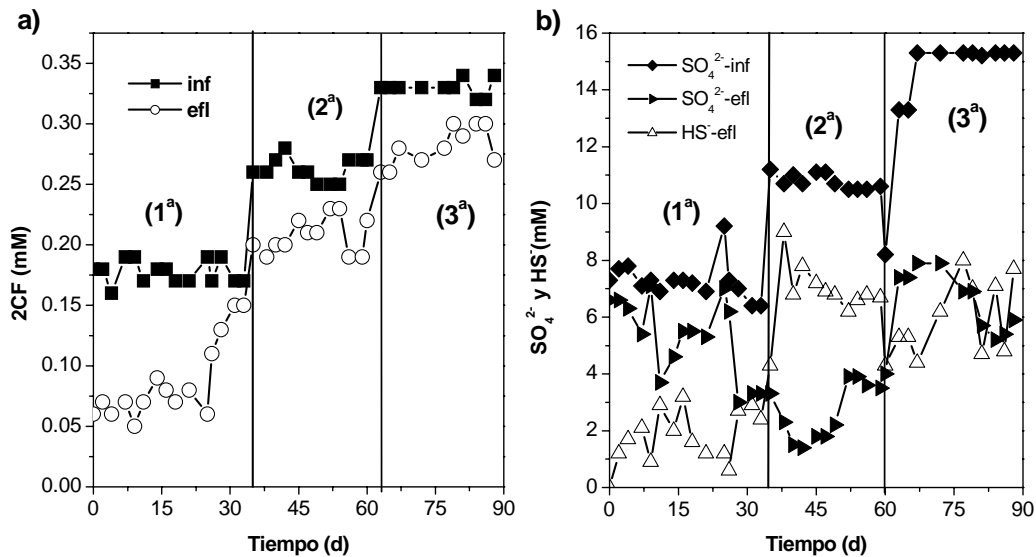


Figura 4.4. Perfil de consumo de 2CF (a) y SO_4^{2-} (b) en el reactor UASB durante la operación en continuo.

Durante la primera etapa cuando se alimentó el reactor con 0.18 ± 0.008 mM de 2CF, se observó que sólo se consumió el 27% (1.98 ± 1.0 mM) del SO_4^{2-} (Figura 4.4b; Tabla 4.2), a una velocidad volumétrica de 0.4 mmol- SO_4^{2-} /L·d. En la siguiente etapa hubo un mayor consumo de sulfato alcanzando 74% (7.81 ± 1.58 mM) como se puede observar en la Figura 4.4b, en tanto que la velocidad volumétrica fue de 1.56 mmol- SO_4^{2-} /L·d, en esta etapa se encontró el mayor consumo, ya que en la 3^a etapa cuando se adicionó una concentración de 0.33 ± 0.01 mM de 2CF el consumo de sulfato decayó hasta 55% al consumirse sólo 8.22 ± 1.56 mM del sulfato alimentado (15 mM), y la velocidad volumétrica se estabilizó en 1.64

mmol-SO₄²⁻/L·d. Esto se pudo deber, como se mencionó anteriormente, al efecto sobre el 2CF en la membrana celular. Comparando ambos reactores, el análisis de varianza (ANOVA) indicó que no hay diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) en el consumo de 2CF entre los reactores, más sin embargo al comparar las velocidades específicas de consumo de 2CF (LFFD 0.019 mM/(gSVI·d) y UASB 0.0007 mM/(gSSV·d)) el reactor LFFD fue más eficiente.

La comparación de los reactores con respecto al consumo de sulfato se discute más detalladamente en la sección de balance de electrones.

El consumo de formiato siguió un perfil similar al observado en el reactor LFFD ya que se consumió 100% en todas las etapas y no fue afectado por los incrementos en la concentración del 2CF (Figura 4.5b, Tabla 4.3) por lo que se recuperó cerca del 100% de carbono en todas las etapas. Durante el tiempo de operación del reactor el pH se estabilizó en 9.1 debido a la formación de HCO₃⁻ proveniente del formiato, por lo que no se detectó producción de CO₂ y durante la operación del reactor se observó que el E° fue disminuyendo hasta alcanzar un valor aproximado de -146.5 mV (Fig. 4.6), el cual fue similar en el reactor LFFD.

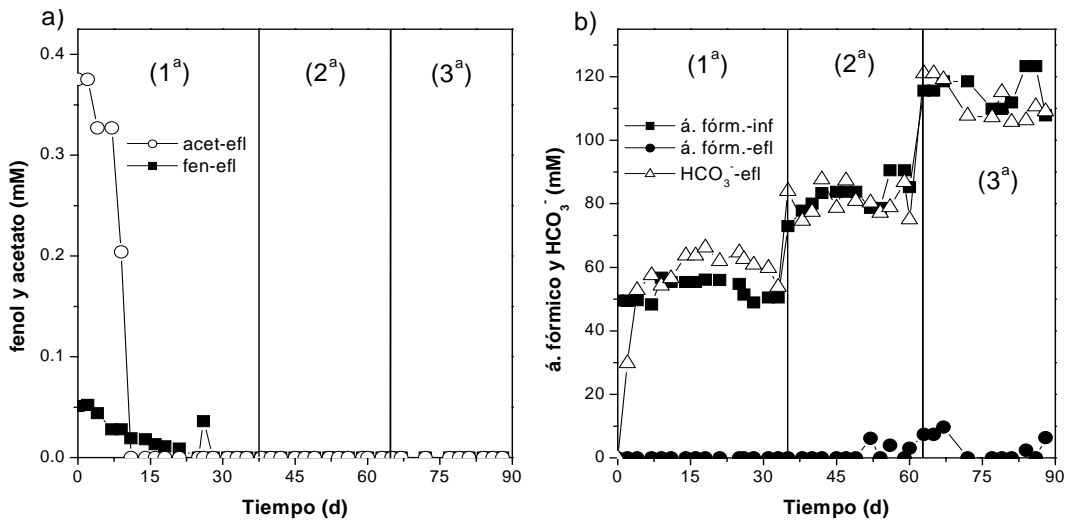


Figura 4.5. Producción de fenol y acetato (a) y consumo de ácido fórmico (b) durante la operación del reactor UASB con incrementos de carga.

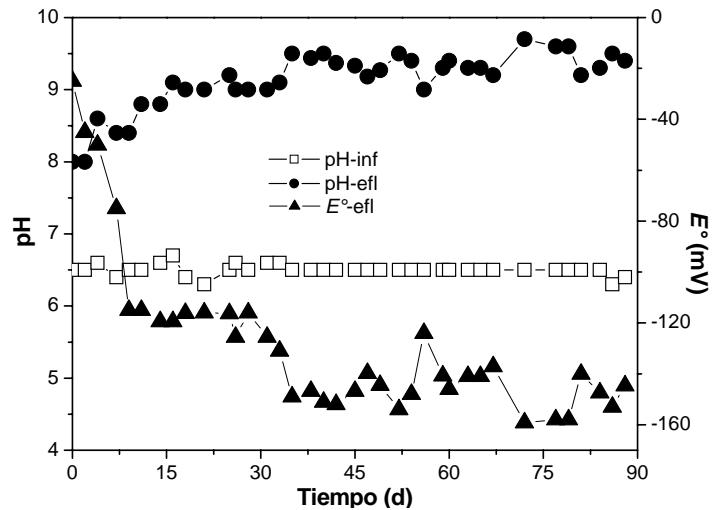


Figura 4.6. Perfil de pH y E° durante la operación del reactor UASB.

4.2.3 Balance de electrones

Como se puede observar a partir del balance de electrones de ambos reactores (LFFD y UASB), durante las tres etapas se produjeron los electrones necesarios para la sulfato-reducción y la deshalogenación del 2CF (Tabla 4.4), esto debido, como se mencionó anteriormente, a que el 2CF no afectó la mineralización del fórmico en ninguno de los reactores. Sin embargo se puede observar que en ambos reactores el 2CF afectó el transporte de electrones hacia el SO_4^{2-} a pesar del exceso de electrones provenientes de la mineralización del ácido fórmico. En las bacterias sulfato reductoras el transporte de electrones se lleva a cabo por los citocromos que se encuentran en la membrana celular (Wall y col, 2008), estas proteínas se pudieron desestabilizar por el 2CF que se puede disolver en la capa lipídica como fue reportado por Sikkema y col. (1995).

Tabla 4.4. Balance de electrones para ambos reactores en cada etapa.

Reactor	2CF (mM) deshalogenado	miliequivalentes (meq) de electrones				
		Donados		Usados		
		Ácido fórmico	Fenol	Sulfato reducción	Dehalogenación del 2CF	En otros procesos
LFFD	0.06	67.71	1.81	38.13	0.13	31.26
	0.04	107.35	1.19	58.41	0.08	50.04
	0.07	176.04	2.15	68.73	0.15	109.31
UASB	0.09	105.06	2.56	15.84	0.18	91.60
	0.05	162.69	1.59	62.46	0.11	101.70
	0.05	224.34	1.37	65.74	0.09	159.87

Comparando ambos reactores con respecto al consumo de sulfato, se observó que el reactor UASB (Figura 4.4b) presentó un menor consumo en comparación al reactor LFFD

(Figura 4.1b) durante las tres etapas de operación. La configuración del reactor LFFD

favoreció el consumo de sulfato, disminuyendo el efecto tóxico del 2CF, debido al mezclado que se da en el reactor mediante la recirculación del efluente lo que permite diluir la concentración del compuesto tóxico (Buitrón y col. 2006) teniendo un menor efecto en el transporte de electrones hacia la cadena respiratoria del SO_4^{2-} en el microorganismo.

En el caso del reactor UASB se observó que el 2CF tuvo un efecto negativo en el flujo de electrones hacia el SO_4^{2-} durante la primera y tercera etapa como se puede observar en las Tablas 4.2 y 4.4.

Los electrones que no fueron usados para reducir sulfato o deshalogenar el 2CF, se pudieron consumir en otros procesos metabólicos como la producción de biomasa o metanogénesis. Rittman y McCarty (2001) han reportado que los microorganismos ocupan una fracción de los electrones producidos para la síntesis de biomasa, que en condiciones anaerobias, es de aproximadamente 10% y el resto de electrones lo utilizan para la producción de metabolitos secundarios, energía de mantenimiento así como la reducción del aceptor de electrones (HCO_3^- , SO_4^{2-} , etc.). Para el reactor LFFD se realizaron cinéticas de actividad sulfato reductora y metanogénica con las biopartículas con un tiempo de duración de 16 días alimentando únicamente fenol como fuente de carbono a una relación $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}=0.76$. En las cinéticas sulfato reductoras se observó que el fenol (0.446 mM) fue transformado a acetato (0.886 mM) y después éste fue mineralizado probablemente a carbonato, por otra parte en las actividades metanogénicas (sin la adición de SO_4^{2-}) no se detectó la formación de metano, a pesar de que en ambas cinéticas no se observó actividad metanogénica, está reportado (Celis-García, 2004) que hay producción de metano bajo sulfato-reducción debido a la competencia por la fuente de carbono por las bacterias

metanogénicas, encontrando que a relaciones de DQO/SO_4^{2-} mayores a 1 las bacterias metanogénicas consumían alrededor del 50% de la DQO alimentada a su sistema.

4.3 Conclusiones

En el reactor LFFD se logró obtener un mayor porcentaje de degradación de 2CF en la primera etapa que fue de 39%. El consumo de sulfato fue disminuyendo conforme se fue incrementando la concentración de 2CF, por otra parte el ácido fórmico fue mineralizado completamente mostrando un perfil similar al de las cinéticas de inhibición para la fuente de carbono ya que en ambos experimentos el consumo de carbono no se vio afectado por el compuesto tóxico (Cap. 3, apartado 3.2.3). En el reactor UASB la degradación máxima de 2CF alcanzada fue de 51% de 2CF en la primera etapa, la cual disminuyó en las siguientes 2 etapas. El consumo de SO_4^{2-} también se afectó con los incrementos en la concentración del 2CF mientras que el ácido fórmico también fue consumido en todas las etapas como en el reactor LFFD, evidenciando nuevamente de que el 2CF afecta el proceso respiratorio del sulfato.

Como se pudo observar en ambos reactores, las condiciones de operación (incrementos de ácido fórmico, sulfato y 2CF) no favorecieron la selección o adaptación de la biomasa para degradar el 2CF, estos resultados son diferentes a los reportados en la literatura en reactores UASB y LFFD, en donde se ha observado que las condiciones de operación y el tipo de co-sustrato utilizado ayudaron a adaptar biomasa capaz de degradar el 2CF en aproximadamente 50 días (Vacca y col. 2008; Chen y col. 2004). Ya que se ha reportado que la variación de estos parámetros, así como las condiciones hidrodinámicas, ambientales y el tipo de soporte utilizado, seleccionan a los microorganismos que son

capaces de adherirse a la superficie, lo que posteriormente afecta al desarrollo y a las propiedades físicas y químicas de la biopelícula (Liu y Tay, 2002; Shieh y Keenan, 1986). Al evaluar los resultados observados para la degradación del 2CF, la estrategia de operación utilizada en ambos reactores no fue la adecuada debido a que no se alcanzó el objetivo de adaptar la biopelícula y el lodo al 2CF.

V. Efecto de la relación DQO/SO₄²⁻ en la degradación del 2CF por una biopelícula sulfato reductora

5.1 Introducción

Durante la sulfato-reducción la relación másica gDQO/gSO₄²⁻ es uno de los parámetros más importantes ya que dependiendo de su valor se pueden favorecer ciertos procesos e inhibir otros. Esta relación representa los gramos de materia orgánica expresada como demanda química de oxígeno (gDQO) por gramo de sulfato presente en el medio. Estequiométricamente, para reducir un mol de SO₄²⁻ hasta sulfuro, la relación debe de ser de 0.67 DQO/SO₄²⁻ (Lens y col. 1998) en donde la materia orgánica aporta 8 electrones necesarios para la reducción de sulfato hasta S²⁻.

Se ha observado que durante el tratamiento de aguas residuales industriales provenientes de refinerías del petróleo, producción de aceite de palma, así como de la producción de melazas y ácido cítrico, las cuales contienen una alta concentración de materia orgánica y sulfato (Speece, 1996), la relación gDQO/gSO₄²⁻ puede favorecer la metanogénesis o la sulfato-reducción (Wang y col. 2008). Sing y Viraraghavan (1998) en el arranque de reactores UASB metanogénicos, fijaron la relación DQO/SO₄²⁻ en 2 y de acuerdo a las condiciones de operación del reactor, observaron que a este valor predomina la actividad sulfato reductora sobre la metanogénica, consumiendo alrededor de 75% de la materia orgánica, lo cual si se incrementa este valor se ve favorecida la metanogénesis como lo han reportado O'Reilly y Colleran (2006). Sin embargo, en estudios llevados a cabo con modelos matemáticos se ha propuesto que a valores de gDQO/gSO₄²⁻= 6 y con una concentración de sulfato por arriba de 0.6 g/L ambos procesos se pueden inhibir como lo han reportado Vavilin y col. (1994).

En la eliminación de compuestos halogenados, específicamente clorofenoles, se ha reportado que la relación DQO/SO₄²⁻ influye en el proceso por el cual se degradan estos compuestos, ya que a relaciones menores a uno, posiblemente solo las BSR son las que llevan a cabo la deshalogenación de los clorofenoles (Basu y col. 2008; Häggblom y Young, 1995; Häggblom y col. 1993), mientras que a relaciones por arriba de éste, intervienen varios grupos de bacterias (Chang y col. 2004) entre ellas las fermentativas. Drzyzga y col. (2001) reportaron que en la degradación de tetracloroetano con un cultivo de *Desulfovibrio sp.* SULF1 y *Desulfotobacterium frappieri* TCE1, en donde utilizaron lactato como fuente de electrones y una relación DQO/SO₄²⁻ = 2, la bacteria sulfato reductora *Desulfovibrio sp.* cepa SULF1 fermentó la fuente de carbono para producir acetato e H₂. El hidrógeno fue consumido por la bacteria deshalogenadora *Desulfotobacterium frappieri* TCE1 para reducir el compuesto clorado, el mecanismo propuesto se basa en la asociación sintrófica entre las dos bacterias y la transferencia de H₂ de una especie a otra.

El objetivo de esta parte del trabajo, fue evaluar el efecto de la variación en la relación DQO/SO₄²⁻ sobre la eliminación de 0.39 mM (50 mg/L) de 2CF por una biopelícula sulfato reductora. Utilizando dos reactores LFFD por un periodo de 98 días, de los cuales uno fue alimentado a una relación de 0.8 (R1) y el segundo a una relación de 2.2 (R2), empleando ácido fórmico como donador de electrones, como se describe en el apartado 2.1.8 de materiales y métodos. El desempeño de ambos reactores se comparó con los resultados del reactor LFFD del experimento reportado en el capítulo 4, el cual fue alimentado a una relación DQO/SO₄²⁻ de 1.4 y en donde se encontró un consumo promedio de 0.06±0.02 mM de 2CF.

La concentración de 2CF empleada en este experimento se encuentra por debajo del umbral que causa inhibición en la biopelícula (CI₅₀) de acuerdo a los resultados mostrados en el capítulo 3, apartado 3.2.1 que fue de 99.8 mg/L de 2CF.

5.2 Resultados

Ambos reactores se operaron bajo las condiciones que se describen en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Condiciones de operación y concentraciones de los sustratos utilizados para los reactores a diferente relación DQO/SO₄²⁻.

Parámetro	Reactor	
	1	2
2CF [mM]	0.39	0.39
gDQO / gSO ₄ ²⁻	0.8	2.2
TRH (d)	5	5
SO ₄ ²⁻ [mM]	10.4	10.4
Q _l (mL/min)	0.277	0.416
RF(L/d)	245.8	472.2
HCO ₂ H [mM]	50.0	136.8

El medio base de alimentación de los dos reactores fue medio mineral Visser (1995).

5.2.1 Operación del R1 a una relación DQO/SO₄²⁻ de 0.8

Durante la operación del R1 la concentración promedio de 2CF en el influente fue de 0.38±0.012 mM y se observó una fase lag durante los primeros 20 días de operación en la cual no se degradó el 2CF (Figura 5.1). El máximo consumo de 2CF se alcanzó en el día 24 (0.2 mM) y decreció hasta 0.095 mM en el día 98, después del día 26 y hasta el día 98 se

observó un consumo promedio de 0.1 ± 0.027 mM de 2CF. Durante el tiempo de operación no se detectó la formación de fenol.

El perfil de degradación del 2CF observado durante este experimento aparentemente se debió a una aclimatación parcial por parte de la biopelícula, debido a que la biomasa inmovilizada no estaba adaptado y por otra parte como el consumo de 2CF fue el mismo durante un periodo de 76 días (Figura 5.1), por lo que no se observó que las condiciones de operación del reactor favorecieran a la microflora bacteriana capaz de consumir el 2CF totalmente. Estos resultados son diferentes a lo reportado en la literatura en donde se ha encontrado que una biopelícula formada a partir de un inóculo no adaptado y en condiciones de sulfato-reducción, fue capaz de adaptarse al 2CF en 40 días de operación (Chang y col. 2004), en contraste en experimentos llevados a cabo en sulfato-reducción con lodos no adaptados a clorofenoles, se ha reportado que el tiempo de adaptación al 2CF es mayor a 100 días (Hägglom y Young, 1990).

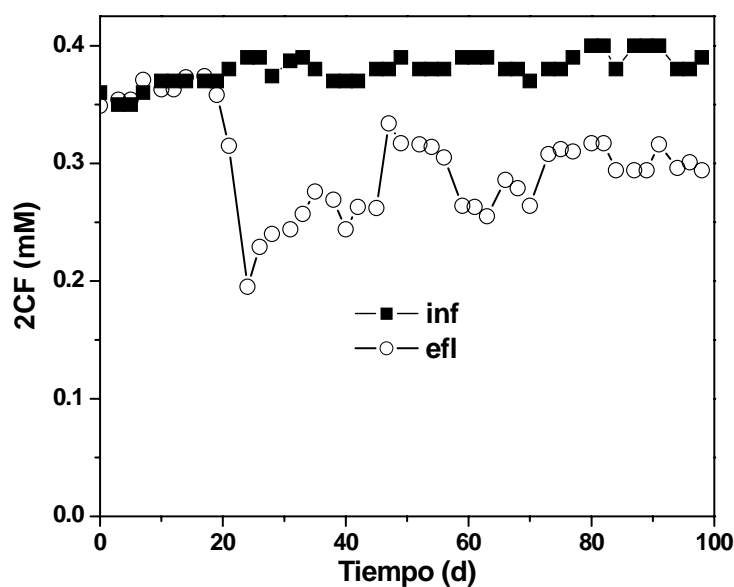


Figura 5.1. Perfil de degradación del 2CF en el R1 durante 98 días de operación.

Con respecto al sulfato, durante el tiempo de operación se consumió un promedio de 3.3 ± 1.0 mM que correspondió a $32 \pm 1.0\%$ del sulfato alimentado (Figura 5.2a) a pesar de que se alimentó a una relación DQO/SO_4^{2-} de 0.8. Se ha reportado que en relaciones superiores a 0.67 se ve favorecido el consumo de sulfato por arriba de 70% (Celis-García, 2004). La baja eficiencia en el consumo de sulfato se debe a la presencia del 2CF, ya que en trabajos previos se ha observado que el 2CF afecta la respiración del sulfato (García-Cruz y col. 2010).

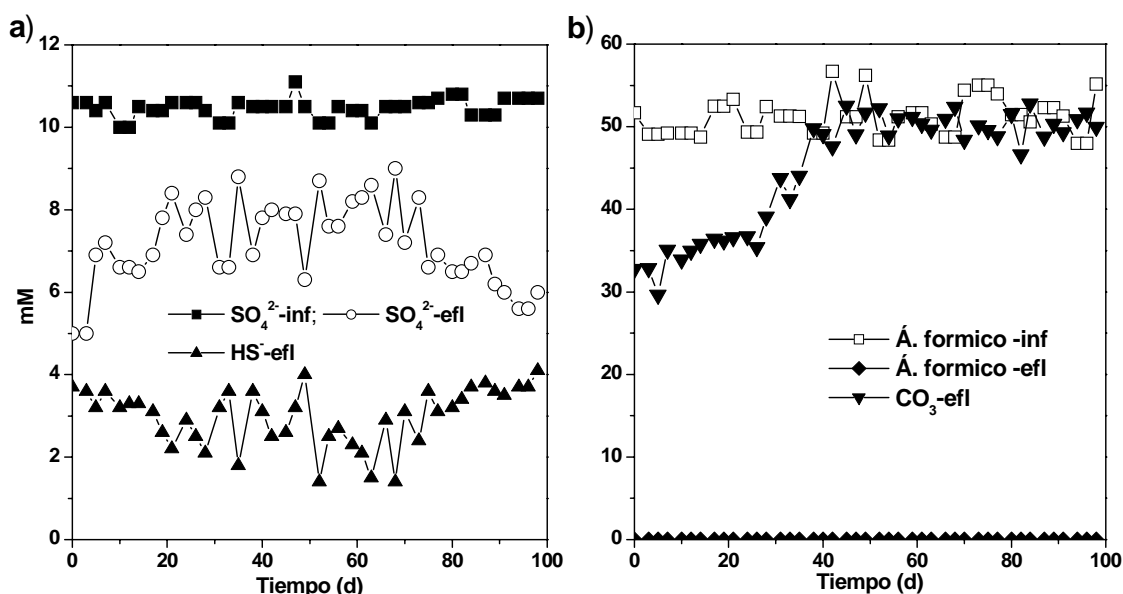


Figura 5.2. Consumo de sulfato (a) y de ácido fórmico (b) en el R1 a una relación $DQO/SO_4^{2-}=0.8$.

Sin embargo como se puede observar en la Figura 5.2a, a partir del día 75 hasta el final del tiempo de operación, se observó un incremento en la concentración del sulfuro en el efluente, o en otras palabras se observó un incremento en el consumo de sulfato hacia el final de la operación del reactor. Este consumo de sulfato no se reflejó en un mayor consumo del 2CF al final del experimento debido a que la concentración en el efluente del

2CF se mantuvo sin cambios, lo que indicaría que la deshalogenación se pudo llevar a cabo por bacterias deshalogenadoras y no estar acoplada a la sulfato-reducción, ya que se ha reportado que la reacción de la deshalogenación se puede llevar a cabo independientemente del tipo de aceptor de electrones presente en el medio, debido a las interacciones de las bacterias presentes (Hägglom y col. 2000).

Durante este trabajo se obtuvo una recuperación de 97% del azufre (Tabla 5.2), mientras que el ácido fórmico fue consumido totalmente, como se muestra en la Figura 5.2b, y fue mineralizado hasta carbonato, con una recuperación de carbono de 88% (Tabla 5.2), el faltante de carbono (12%) pudo usarse en síntesis de biomasa (Montalvo y Guerrero, 2003). Durante el tiempo de operación el pH del efluente se mantuvo en 8.8 (±0.4) lo que favoreció que el sulfuro y el carbonato permanecieran en la fase líquida. Durante este experimento no se midió el potencial oxido-reductor del reactor.

Tabla 5.2. Consumo y producción de especies azufradas y carbonadas durante los 98 días de operación de ambos reactores.

Reactor	Influente (mM)	Efluente (mM)		Recuperado (%)
R1	S-SO ₄ ²⁻ 10.5 ±0.24	S-SO ₄ ²⁻ 7.2 ±1.01	S-HS ⁻ 3.0 ±1.65	97.0±1.6
	C-HCOOH 51.19 ±2.3	C-HCOOH 0	C-HCO ₃ ⁻ 45.1 ±7.2	88.1±7.2
R2	S-SO ₄ ²⁻ 10.6 ±0.4	S-SO ₄ ²⁻ 1.9 ±1.7	S-HS ⁻ 8.0 ±1.8	93.1±1.7
	C-HCOOH 138.8 ±1.6	C-HCOOH 3.6 ±12.6	C-HCO ₃ ⁻ 124.2 ±10.6	92.1±12.6

5.2.2 Operación del R2 a una relación DQO/SO₄²⁻ de 2.2

Durante la operación del R2 se alimentó un promedio de 2CF de 0.39±0.015 mM. Con respecto al consumo de 2-clorofenol, no se observó una fase lag a diferencia del R1, ya que como se muestra en la Figura 5.3, el 2CF se consumió desde el primer día, obteniendo un consumo promedio de 0.09±0.027 mM. Durante el tiempo de operación se encontró que el máximo consumo fue en el día 72 (0.14 mM), por otra parte no se alcanzó la eliminación total del 2CF, como se ha reportado utilizando relaciones DQO/SO₄²⁻ mayores a 1.0 (Chang y col. 2004). Sin embargo no se observó que la deshalogenación del 2CF estuviera acoplada a la sulfato-reducción, debido a que el 2CF no presentó el mismo perfil de consumo durante el tiempo de operación del reactor (Figuras 5.3 y 5.4a), lo que evidenciaría que no hubo una competencia por los equivalentes de electrones entre el 2CF y el sulfato aportados por el ácido fórmico.

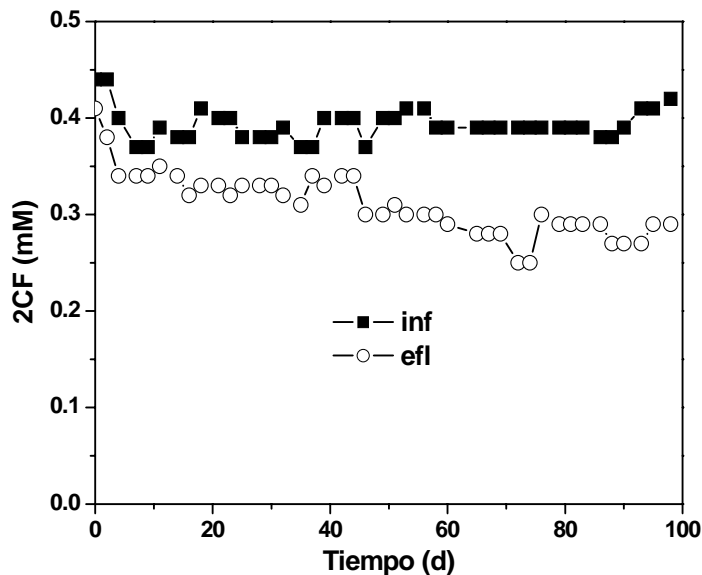


Figura 5.3. Perfil de degradación del 2CF en el R2.

En estudios llevados a cabo por Drzyzga y col. (2001) evaluaron la degradación de moléculas cloradas como el tetracloroetano en donde utilizaron varias relaciones DQO/SO₄²⁻ mayores a 2, alimentando lactato como fuente de carbono y electrones, observaron que no hubo una competencia entre el sulfato y el compuesto halogenado por los electrones donados lo que permitió que se llevara a cabo la deshalogenación.

Durante el tiempo de operación del reactor no se detectó fenol ni acetato. Se observó que el consumo máximo de 2-clorofenol en ambos reactores fue muy similar, en el R2 fue de 0.14 mM, mientras que en el R1 fue de 0.2 mM, a pesar de que se alimentó a una mayor concentración de ácido fórmico. Al hacer un análisis de varianza ($\alpha < 0.05$) en ambos reactores para el consumo total de 2CF, se pudo observar que no hubo diferencia significativa, por lo que la concentración de carbono no afectó el consumo de 2-clorofenol.

En la Figura 5.4 se muestra el perfil de consumo de sulfato y el de formación de sulfuro durante la operación del R2. Se observó que durante los primeros 42 días, el SO₄²⁻ alcanzó un consumo de 98±0.46% (10.6±0.46 mM). Posteriormente en los siguientes 18 días se observó una disminución en el consumo de sulfato, a una velocidad de 0.16 mol/L·d durante este periodo. La degradación de SO₄²⁻ se estabilizó en el día 60 hasta el día 98, con un consumo promedio de 6.9±0.5 mM. Lo que indicó una disminución de 32% comparado con el sulfato consumido en los primeros 42 días de operación. La disminución en el consumo del sulfato se pudo deber a una acumulación y a un efecto del 2CF en la biopelícula como se ha reportado (Garcia-Cruz y col. 2010; Jin y Bhattacharya, 1997), ya que por sus características físico-químicas, el 2CF es una molécula hidrofóbica por lo que es una sustancia liposoluble y se puede disolver en la membrana de los microorganismos e interrumpir los procesos bioquímicos de la bacteria (Sikkema y col. 1995). Durante la

operación del reactor, bajo estas condiciones, se observó una recuperación de azufre de 93% (Tabla 5.2). El ácido fórmico fue consumido en un 97% y convertido a carbonato (Figura 5.4b) con una recuperación de carbono de 92% (Tabla 5.2), por lo que el pH del efluente fue de 9.5 (± 0.4). Durante este experimento no se midió el potencial de óxido reducción.

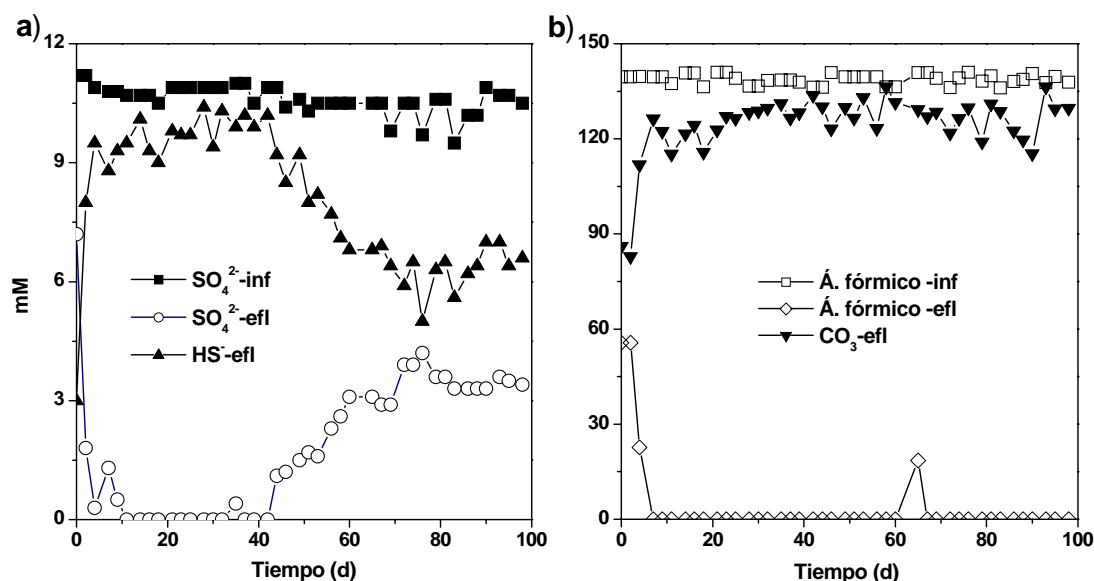


Figura 5.4. Perfiles de consumo de sulfato (a) y de ácido fórmico (b) durante el tiempo de operación del R2.

5.2.3 Balance de electrones para ambos reactores

En la Tabla 5.3 se muestra el balance de electrones en miliequivalentes para ambos reactores. Se observa que los meq que se usaron para deshalogenar el 2CF fueron prácticamente los mismos, independientemente de cuál fue la relación DQO/SO₄²⁻ en la alimentación. En cambio se observa que los miliequivalentes usados para la reducción de sulfato fueron 2.6 veces más en el R2 (DQO/SO₄²⁻ = 2.2) que en el R1 (DQO/SO₄²⁻ = 0.8). Durante este experimento no se observó que el aporte de electrones generados por el ácido

fórmico favoreciera la degradación del 2CF, ya que a partir del balance de electrones se pudo observar (Tabla 5.3) que se requerían 0.77 miliequivalentes para deshalogenar el 2CF y el ácido fórmico produjo 102.4 miliequivalentes, lo que indicó que se proporcionaron los meq necesarios para deshalogenar todo el 2CF.

Lo anterior indica que la deshalogenación de 2CF que se observó fue independiente de la sulfato-reducción. Al término del experimento se deshalogenaron en promedio 0.1 (±0.03) y 0.09 (±0.03) mM de 2CF en el R1 y el R2 respectivamente, al hacer un análisis estadístico (ANOVA) se encontró que no hubo una diferencia significativa ($\alpha \leq 0.05$) en la degradación del clorofenol, esto indica que la variación en la relación DQO/SO₄²⁻ no favoreció la degradación del 2CF.

Tabla 5.3. Balance de electrones en los dos reactores a diferentes relaciones DQO/SO₄²⁻.

Reactor	2CF (mM) deshalogenado	miliequivalentes de electrones por mmol de compuesto				
		Donados		Usados		
		Ácido fórmico	Fenol*	Sulfato reducción	Dehalogenación del 2CF	En otros procesos
R1	0.1	102.38	2.8	26.4	0.2	70.7
R2	0.09	270.37	2.6	69.94	0.18	180.21

*Nota: los meq aportados por el fenol se calcularon a partir del 2CF consumido y asumiendo que se mineralizó completamente hasta CO₂.

Por otra parte en ambos reactores se alcanzó casi 100% en el consumo del ácido fórmico lo que da evidencia de que el proceso de mineralización de ácido fórmico a CO₂ no resultó afectado por la presencia del 2CF. En contra parte, la baja eficiencia en el consumo de SO₄²⁻ en ambos reactores se podría deber a que el 2CF es una molécula hidrofóbica por lo

que se puede disolver en la membrana celular desestabilizando el transporte de electrones del ácido fórmico al SO₄²⁻ como se muestra en la Figura 5.5.

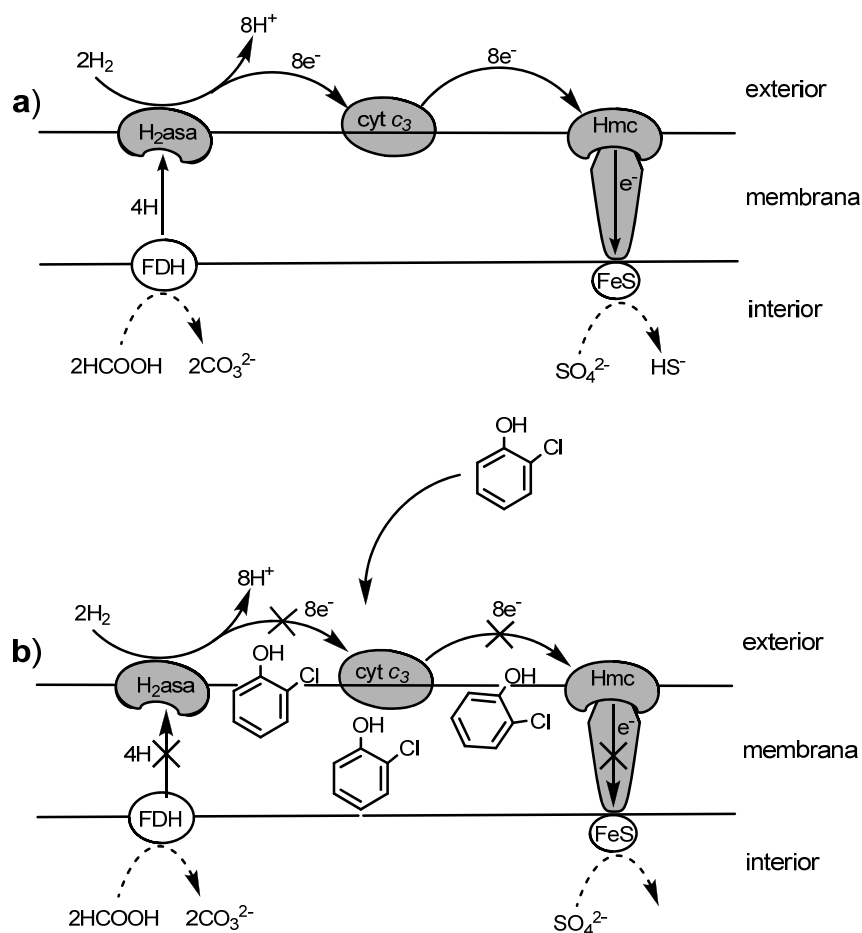


Figura 5.5. Posible efecto del 2CF en el consumo de sulfato. (a) Durante la sulfato-reducción el transporte de electrones se lleva a cabo a través de la membrana celular en donde intervienen diferentes citocromos y enzimas (Madigan y Martinko, 2005), (b) en presencia del 2CF en el medio éste puede disolverse en la membrana (Sikkema y col. 1995) por lo que podría desestabilizar el transporte de electrones, lo que impediría que estos fueran utilizados en la reducción del SO₄²⁻. (FDH= formato deshidrogenasa; H₂asa= deshidrogenasa; cyt c₃= citocromo c3; Hmc= citocromo; FeS= ferro-sulfoproteína).

Durante este experimento no se observó que el 2CF se consumiera totalmente, durante el tiempo de operación de los reactores, a pesar de que se utilizó un donador de electrones (ácido fórmico), estos resultados son diferentes a lo reportado por otros autores (Chan y col,

2004; Drzyzga y col. 2001) en donde han observado que la presencia de un donador de electrones favorece la adaptación y la degradación del 2CF. El bajo consumo del 2CF se pudo deber a que el inóculo no estaba adaptado a compuestos clorofenólicos por tal motivo no se favoreció el crecimiento de una población microbiana capaz de consumir el 2CF, por otra parte las condiciones hidrodinámicas y de operación del reactor LFFD no podrían haber favorecido la fijación de bacterias deshalogenadoras y por ende su crecimiento o adaptación al compuesto tóxico dentro de la biopelícula generada en el reactor.

5.3 Conclusiones

Al comparar ambos reactores se pudo observar que la concentración de carbono no influyó en la degradación del 2CF debido a que al final del experimento no se encontró una diferencia significativa ($\alpha \leq 0.05$) en el consumo de 2CF al hacer un análisis estadístico de ANOVA con respecto al consumo de 2CF entre el R1 y R2. Al comparar estadísticamente los reactores R1 (DQO/SO₄²⁻ = 0.8) y R2 (DQO/SO₄²⁻ = 2.2) con el reactor LFFD que fue operado a una relación DQO/SO₄²⁻ de 1.4 (cap. 4), se encontró que éste último, fue diferente a los reactores R1 y R2, el cual tuvo el menor consumo de 2CF (0.06±0.02 mM). Estos resultados indicaron para el R1 y el R2 que la relación DQO/SO₄²⁻ no influyó en el consumo de 2CF, sin embargo se observó una diferencia en las condiciones operacionales de los reactores entre una alimentación fija (R1 y R2) y con incrementos (LFFD a DQO/SO₄²⁻ = 1.4, Cap.4) de 2CF, siendo esta última menos favorable para la aclimatación al 2CF.

Por otra parte se observó que a una DQO/SO₄²⁻ de 2.2, el exceso de electrones presentes permitió que se llevaran a cabo la deshalogenación y la sulfato-reducción al mismo tiempo desde un inicio, pero no favoreció un aumento en la degradación del

compuesto halogenado, sin embargo se encontró que el 2CF afectó el consumo del sulfato aproximadamente a la mitad del tiempo de operación del reactor.

VI. Conclusiones generales y recomendaciones

1. Conclusiones generales

Durante la evaluación de toxicidad de los clorofenoles ensayados en biopelículas no expuestas a estos compuestos, se encontró que el proceso de sulfato-reducción fue inhibido en todos los ensayos, en contraste el consumo de etanol fue afectado a concentraciones altas, observándose que los diclorofenoles ejercieron una mayor toxicidad sobre la respiración del sulfato y la conversión de etanol a acetato que los compuestos monoclorados y de acuerdo a la CI_{50} el patrón de toxicidad encontrado fue $2,4DCF > 2,4D > 2CF > 4CF > \text{fenol}$, lo que indicó que el número de átomos de Cl⁻ y la complejidad de la molécula incrementaron la toxicidad. Durante estas cinéticas no se detectó la deshalogenación o consumo de los compuestos clorados.

En la operación de los reactores con incrementos de concentración de 2CF se observó que la mayor degradación se llevó a cabo durante la primera etapa en los reactores LFFD y UASB cuando se agregaron 0.19 mM de 2CF. Durante los primeros días de esta etapa se detectó fenol y acetato que fueron consumidos en corto tiempo, por otra parte no se observó diferencia significativa en la cantidad consumida de 2CF entre los reactores.

El menor consumo de sulfato en ambos reactores se encontró en la última etapa cuando se alimentó la mayor concentración de 2CF (0.39 mM), a su vez la fuente de carbono (ácido fórmico) se consumió completamente en las tres etapas con lo que se aportó el suministro de los electrones necesarios para la sulfato-reducción y la deshalogenación. Sin embargo se encontró un 45% de la sulfato-reducción y un 85% de la deshalogenación del 2CF que no se llevó a cabo en el reactor UASB, mientras en el reactor LFFD fue de 21.4 y 76.5% para dichos procesos respectivamente.

Al operar los reactores LFFD a relaciones de DQO/SO_4^{2-} de 0.8 y 2.2 y a una concentración constante de 0.39 mM de 2CF, no se observó diferencia significativa en el consumo del compuesto clorado.

En el reactor operado bajo una relación de 2.2, se observó un consumo desde un inicio de 2CF a diferencia del reactor operado bajo una relación de 0.8. Sin embargo la relación DQO/SO_4^{2-} de 2.2 ayudó a mitigar el efecto tóxico del 2CF sobre el consumo de sulfato. En ambos reactores se consumió en un 100 % el ácido fórmico y como ya se había observado en el experimento la deshalogenación solamente se llevó a cabo en los reactores R1 y R2 en 28 y 26%, respectivamente.

La estrategia de operación con incrementos de concentración y la variación de la DQO/SO_4^{2-} no llevó a la completa adaptación de la biomasa a la degradación del 2CF a partir de un lodo o biopelícula no expuesta a clorofenoles.

Recomendaciones

Evaluar relaciones DQO/SO_4^{2-} menores a 0.66 con el fin de estresar a los microorganismos para inducirlos a que consuman el 2CF.

Estudiar la formación de la biopelícula alimentando un compuesto clorofenólico como el 2-clorobenzoato, que es un intermediario en la deshalogenación y consumo de compuestos clorados.

Investigar la capacidad de lodos provenientes de sitios expuestos a una fuerte contaminación por clorofenoles o compuestos halogenados como son los provenientes de plantas de tratamiento de la industria petroquímica o de la fabricación de herbicidas.

VII. Referencias bibliográficas

- Abarnou, A. y Miossec, L. (1992). Chlorinated waters discharged to the marine environment chemistry and environmental impact, An overview. *The Science of the total Environment*. **126**:173-197.
- Adriaens, P. y Barkovskii, A.L. (2003). Halogenated aromatics: fate and microbial degradation. *Encyclopedia of Environmental Microbiology*.
- Albrechtsen, H.J., Mills, M.S., Aamand, J. y Bjerg, P.L. (2001). Degradation of herbicides in shallow Danish aquifers: an integrated laboratory and field study. *Pest Management Science*. **57**:341-350.
- Ali, M. y Sreerishnan, T.R. (2001). Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review. *Advances in Environmental Research*. **5**: 175-196.
- Atuanya, E. I. y Chakrabarti, T. (2003). Biotreatability and kinetics of UASB reactor to mixtures of chlorophenols pollutants. *Environmental Monitoring and Assessment*. **83**: 283-294.
- Atuanya, E. I. y Chakrabarti, T. (2004). Kinetics of biotransformation of 2,4-dichlorophenol using UASB-reactor. *Environmental Monitoring and Assessment*. **96**: 129-141.
- Bae, H.S., Yamagishi, T. y Suwa, Y. (2002). Evidence for degradation of 2-chlorophenol by enrichment cultures under denitrifying conditions. *Microbiology*. **148**: 221-227.
- Barton, L. L. and Plunkett, R. M. 2003. Sulfate-Reducing Bacteria: Environmental and Technological Aspects. *Encyclopedia of Environmental Microbiology*.
- Basu, S.K., Oleszkiewicz, J.A. y Sparling, R. (2005). Effect of sulfidogenic and methanogenic inhibitors on reductive dehalogenation of 2-chlorophenol. *Environ.Technol.* **26**: 1383-1391.
- Beaudette, L. A., Cassidy, M.B., Habash, M., Lee, H., Trevors, J.T. y Staddon, W.J. (2002). Microbial dehalogenation reactions in microorganisms. en *Enzymes in the environment: activity, ecology and applications*. Ed. Burns, R. G. y Dick, R.P.,
- Becker, J. G., Berardesco, G., Rittmann, B. E. y Stahl, D. A. (2005). The role of syntrophic associations in sustaining anaerobic mineralization of chlorinated organic compounds. *Environmental Health Perspectives*. **113**(3): 310-316.
- Beech, I.B. (2003). Biocorrosion: Role of sulfate reducing bacteria. *Encyclopedia of Environmental Microbiology*.
- Beeman, R.E., Howell, J.E., Schumaker, S.H., Salazar, E.A. y Buttram, J.R. (1983). A field evaluation of *in-situ* microbial reductive dehalogenation by the biotransformation of chlorinated ethynes. en *In-Situ and On-Site Bioremediation*. Ed Hinchee R.E., Lewis Publishers , Boca Raton Florida, pp. 14-27.
- Bhatt, P., Kumar, M.S., Mudliar, S. y Chakrabarti, T. (2007). Biodegradation of Chlorinated Compounds-A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. **37**:165-198.
- Blum, D.J.W. y Speece, R.E. (1991a). Quantitative structure-activity relationships for chemical toxicity to environmental bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **22**:198-224.
- Blum, D.J.W. y Speece, R.E. (1991b). A database of chemical toxicity to environmental bacteria and its use in interspecies comparisons and correlations. *Res. J. Water Pollut. Control Fed.* **63**(3):198-207.
- Bradberry, S.M., Proudfoot, A.T. y Vale, J.A. (2004). Poisoning due to chlorophenol and phenoxy herbicides. *Toxicol. Rev.* **23**(2):65-73.
- Bossert, I.D., Häggblom, M.M. y Young L.Y. (2003). Microbial ecology of dehalogenation. En Häggblom, M.M. and Dossert, I.D. (ed) *Dehalogenation: Microbial Processes and Environmental Applications*. Capitulo 2. pp. 33-52.
- Boyle, A.W., Victoria, K.K., Häggblom, L. y Young, L.Y. (1999). Transformation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in four different marine and estuarine sediments: effects of sulfate, hydrogen and acetate on dehalogenation and side-chain cleavage. *FEMS Microbiol. Ecol.* **29**:105-113.

- Boyd, S. A., Shelton, D. R., Berry, D. y Tiedje, J. M. (1983). Anaerobic biodegradation of phenolic compounds in digested. *Appl. Environ. Microb.* **46**(1): 50-54.
- Boyd, S. A. y Shelton, D. R. (1984). Anaerobic biodegradation of chlorophenols in fresh and acclimated sludge. *Applied and Environmental Microbiology.* **47**(2):272-277.
- Castro, H.F., Williams, N.H. y Ogram, A. (2000). Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**: 1-9.
- Castro, C.E. (2003). Environmental dehalogenation-problems and recommendations. En Häggblom, M.M. and Dossert, I.D. (ed) Dehalogenation: Microbial Processes and Environmental Applications. Capítulo 18. pp. 469-479.
- Cederlund, H., Börjesson, E., Önnby, K. y Stensström, J. (2007). Metabolic and cometabolic degradation of herbicides in the fine material of railway ballast. *Soil Biology & Biochemistry.* **39**:473-484.
- Celis-García, L. B. (2004). Bioeliminación de óxidos de azufre de efluentes. Tesis Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana, México.
- Chang, C., Tseng, S., Chang, C. y Ho, C. (2004). Degradation of 2-chlorophenol via hydrogenotrophic biofilm under different reductive conditions. *Chemosphere.* **56**: 989-997.
- Characklis, W. y Marshall, K.C. (1990) Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach. En Biofilms (ed. W. Characklis y K.C. Marshall). pp. 3-15. John Wiley & Sons, New York.
- Chen, Y., Cheng, J.J. y Creamer, K.S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology.* **99**: 4044-4064.
- Chin, H., Elefsiniotis, P. y Singhal, N. (2005). Biodegradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using an acidogenic anaerobic sequencing batch reactor. *J. Environ. Eng. Sci.* **4**:57-63.
- Commandeur, L., C., M. y Parsons, J., R., (1990). Degradation of halogenated aromatic compounds. *Biodegradation.* **1**:207-220.
- Cord-Ruwisch R. (1985) A quick method for determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *J. Microbiol. Meth.* **4**: 33-36.
- Czaplicka, M. (2004). Sources and transformation of chlorophenols in the natural environment. *Sci. of the total Environ.* **322**: 21-39
- Davore, M. y Fogarty, A.M. (2005) Ecotoxicological evaluation of the biocidal agents sodium o-phenylphenol, sodium o-benzyl-p-chlorophenol and sodium p-tertiary amylphenol. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* **60**(2):203-212.
- DeLorenzo, M. E., Scott, G. I. and Ross, P. E. (2001), Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: A review. *Environ. Tox. Chem.*, **20**: 84-98.
- De Weerd, K.A., Mandelco, L., Tanner, R., Woese, C., y Suflita, J. M. (1990). *Desulfomonile tiedjei* ge. nov. and sp. nov., a novel anaerobic, dehalogenating, sulfate reducing bacteria. *Arch. Microbiol.* **154**:23-30.
- Dexter Dyer, B. (2003). *A Field Guide to Bacteria*. Comstock Publishing Associates/Cornell University Press. Ithaca, NY, USA and London, UK.
- Díaz, E. (2004). Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *International Microbiology.* **7**: 173-180.
- Dolfing, J. y Harrison, B.K. (1992). Gibbs free energy of formation of halogenated aromatic compounds and their potential role as electron acceptors in anaerobic environments. *Environ. Sci. Technol.* **26**:2213-2218.
- Dolfing, J. (2003). Thermodynamic considerations for dehalogenation. En Häggblom, M.M. and Dossert, I.D. (ed) Dehalogenation: Microbial Processes and Environmental Applications. Capítulo 4. pp. 89-114.
- Drzyzga, O., Gerritse, J., Dijk, J.A., Elissen, H. y Gottschal, J.C. (2001). Coexistence of sulphate-reducing *Desulfovibrio* species and the dehalorespiring *Desulfitobacterium frappieri* TCE1 in defined chemostat cultures grown with various combinations of sulphate and tetrachloroethene. *Environ. Microbiol.* **3**(2): 92-99.

- Ehlers, G.A. y Rose, P.D. (2006). The potential for reductive dehalogenation of chlorinated phenol in a sulphidogenic environment in *in situ* enhanced biodegradation. *Water SA*. **32**(2):243-248.
- Eklund, G., Pedersen, J. R. y Strömberg, B. (1986). Phenol and HCl at 550°C yield a large a variety of chlorinated toxic compounds. *Nature*. **320**:155-156.
- El Fantroussi, S., Naveau, H. y Agathos, S.N. (1998). Review: Anaerobic dechlorinating bacteria. *Biotechnol. Prog.* **14**: 167-188.
- Ennik-Marsen, K., Louwerse, A., Roelofsen, W. y Stams, A. (1998). Influence of monochlorophenols on methanogenic activity in granular sludge, *Water Res.* **32**: 2977–2982.
- Ensley, D. y Suflita, J. (1995). Metabolism of environmental contaminants by mixed and pure cultures of sulfate-reducing bacteria, En: L. Barton (Ed.), *Sulfate Reducing Bacteria* (Biotechnology Handbooks vol. 8), Plenum Press, New York. pp. 293-332.
- Fetzner, S. y Lingens, F. (1994). Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics and biotechnological applications. *Microbiol. Rev.* **58**(4):641-685.
- Fetzner, S. (1998). Bacterial dehalogenation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**:633-657.
- Field, J.,A. y Sierra-Alvarez, R. (2008). Microbial degradation of chlorinated phenols. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **7**:211-241.
- García, C.U., Celis, L.B, Poggí, H. y Meraz, M. (2010). Inhibitory concentrations of 2,4D and its possible intermediates in sulfate reducing biofilms. *J. Hazard. Mater.* **179**:591-595.
- Gaston, L.A. y Locke, M.A., (2000). Acifluorfen sorption, degradation and mobility in a Mississippi delta soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **64**:112-121.
- German, B., Razo-Flores, E., Meraz, M. y Alatríste-Mondragon, F. (2006). Biological wastewater treatment systems, En: Cervantes, J.F., Pavlostathis, S.G. y van Haandel A.C. (Ed.) *Advanced biological treatment processes for industrial wastewater: principles and applications*. IWA publishing, Union Kingdom. pp. 141-185.
- Genthner, B.R.S., Price, W.A. y Pritchard, P.H. (1989). Anaerobic degradation of chloroaromatic compounds in aquatic sediments under a variety of enrichment conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**(6): 1466-1471.
- Getenga, Z.M., Madadi, V. y Wandiga, S.O. (2004). *Studies on biodegradation of 2,4-D and Metribuzin in soil under controlled conditions.* **72**:504-513.
- Gibson, S. A. y Suflita, J. M., (1986). Extrapolation of biodegradation results to groundwater aquifers: reductive dehalogenation of aromatic compounds. *Appl. Environ. Microb.* **52**(4):681-688.
- Gibson, S. A. y Suflita, J. M., (1990). Anaerobic biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid in samples from a methanogenic aquifer: stimulation by short-chain organic acids and alcohols. *Appl. Environ. Microb.* **56**(6):1825-1832.
- Gibson, S. A. y Suflita, J. M., (1993). Role of electron-donating cosubstrates in the anaerobic biotransformation of chlorophenoxyacetates to chlorophenols by a bacterial consortium enriched on phenoxyacetate. *Biodegradation.* **4**:51-57.
- Glezer, V. (2003). Environmental effects of substituted phenols. En Rappoport Z. (ed) *The Chemistry of Phenols*. Capitulo 18. pp. 1347-1368.
- Grötzschel, S., Köster, J. y de Beer, D. (2004). Degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) by a hypersaline microbial mat and related functional changes in the mat community. *Microbial Ecology.* **48**:254-262.
- Goldberg, D.E. (1995). Emerging problems in the costal zone for the twenty-first century. *Mar. Pollut. Bull.* **31**:152-158.
- Häggbloom, M.M. y Young, L. (1990). Chlorophenol degradation coupled to sulfate reduction. *Appl. Environ. Microb.* **56**(11):3255-3260.
- Häggbloom, M.M., Rivera, M.D. y Young, L.Y. (1993). Influence of alternative electron acceptors on the anaerobic biodegradability of chlorinated phenols and benzoic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(4): 1162-1167.

- Hägglblom, M.M. y Young, L. (1995). Anaerobic degradation of halogenated phenols by sulfate reducing consortia. *Appl. Environ. Microb.* **61**(4): 1546-1550.
- Hägglblom, M.M., Rivera, M.D. y Young, R.L. (1996). Anaerobic degradation of halogenated benzoic acids coupled to denitrification observed in a variety of sediment and soil samples. *FEMS Microbiol. Letters.* **144**: 213-219.
- Hägglblom, M.M. (1998). Reductive dechlorination of halogenated phenols by a sulfate-reducing consortium. *FEMS Microbiol. Ecol.* **26**: 35-41.
- Hägglblom, M.M., Knight, V.K. y Kerkhof, L.J. (2000). Anaerobic decomposition of halogenated aromatic compounds. *Environmental Pollution.* **107**: 199-207.
- Hägglblom, M.M. y Bossert, I.D. (2003). Halogenated organic compounds-a global perspective. En Hägglblom, M.M. and Dossert, I.D. (ed) Dehalogenation: Microbial Processes and Environmental Applications. Capitulo 1. pp. 9-13.
- Hallberg, K.B., Kelly, M.P. y Tuovinen, O.H. (1991). Simultaneous degradation of the herbicides 2,4-dichloropenoxyacetic acid and 2-(2-methyl-4-chlorophenoxy)propionic acid by mixed bacterial cultures. *Current Microbiology.* **23**:65-69.
- Harwood, C.S., Burchhardt, G., Herrmann, H. y Fuchs, G. (1999). Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. *FEMS Microbiol. Reviews.* **22**:439-458.
- Heider, J. y Rabus, R. (2008). Genomic Insights in the Anaerobic Biodegradation of Organic Pollutants. En Díaz, E. (ed.) Microbial Biodegradation : Genomics and Molecular Biology. Capitulo 2. pp. 25-54.
- Holliger, C., Wohlfarth, G. y Diekert, G. (1999). Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol. Reviews.* **22**:383-398.
- Holliger, C., Regard, C. y Diekert, G. (2003). Dehalogenation by anaerobic bacteria. En Hägglblom, M.M. y Dossert I. (ed) Dehalogenation: Microbial Processes and Environmental Applications. Capitulo 5. pp. 115-158.
- Imlay, J.A. (2002). How oxygen damages microbes: oxygen tolerance and obligate anaerobiosis. *Adv. Microb. Physiol.* **46**: 111-153.
- Jin, P. y Bhattacharya, S.K. (1997). Toxicity and biodegradation of chlorophenols in anaerobic propionate enrichment cultura. *Water Environ. Res.* **69**(5):938-947.
- Kazumi, J., Hägglblom, M.M., Young, L.Y. (1995). Diversity of anaerobic microbial processes in chlorobenzoate degradation: nitrate, iron, sulfate and carbonate as electron acceptors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 929-936.
- Kilpi, S. (1980). Degradation of some phenoxy acid herbicides by mixed cultures of bacteria isolated from soil treated with 2-(2-methyl-4-chloro)phenoxypropionic acid. *Microb. Ecol.* **6**:261-270.
- Kim, I.S., Young, J.C. y Tabak, H.H. (1994). Kinetics of acetogenesis and methanogenesis in anaerobic reactions under toxic conditions. *Water Environ. Res.* **66**:119-132.
- Knoblauch, C., Sahm, K. y Jorgensen, B.B. (1999). Psychrophilic sulfate-reducing bacteria isolated from permanently cold Arctic marine sediments: description of *Desulfofrigus oceanense* gen. nov., sp. nov., *Desulfofrigus fragile* sp. nov., *Desulfofaba gelida* gen. nov., sp. nov., *Desulfotalea psychrophila* gen. nov., and *Desulfotalea arctica* sp. nov.. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 1631-1643.
- Kuhn, E. P., G. T. Townsend, and J. M. Suflita. 1990. Effect of sulfate and organic carbon supplements on reductive dehalogenation of chloroanilines in anaerobic aquifer slurries. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2630-2637.
- Kohring, G.W., Zhang, X. y Wiegel, J. (1989). Anaerobic dechlorination of 2,4-dichlorophenol in freshwater sediments in the presence of sulfate. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**(10):2735-2737.
- Kolmert Å, Wikström P and Hallberg K. (2000) A fast and simple turbidimetric method for the determination of sulfate in sulfate-reducing bacterial cultures. *J. Microbiol. Meth.* **41**: 179-184.

- Lens, P.N.L., Visser, A., Janssen, A.J.H., Hulsoff Pol, L.W. y Lettinga, G. (1998). Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **28**(1):41 – 88.
- Liamleam, W. y Annachhatre, A.P. (2007). Electron donors for biological sulfate reduction. *Biotechnology Advances.* **25**: 542-463.
- Lipthay, J.R., Tuxen, N., Johnsen, K., Hansen, L.H., Albrechtsen, H., Bjerg, P.L. y Aamand, J. (2003). In situ exposure to low herbicide concentrations affects microbial populations composition and catabolic gene frequency in an aerobic shallow aquifer. *Applied and Environmental Microbiology.* **69**(1):461-467.
- Liu, Y. y Tay, J.H. (2002). The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Res.* **36**: 1653-1665.
- Löffler, F.E., Cole, J.R., Ritalahti, K.M., Tiedje, J.M. (2003). Diversity of dechlorinating bacteria. En Häggblom, M.M. y Dossert I. (ed.) Dehalogenation: Microbial Processes and Environmental Applications. Capítulo 3. pp. 53–87.
- Lovley, D. R., Chapelle, F. H. y Woodward, J.C. (1994). Use of dissolved H₂ concentrations to determine distribution of microbially catalyzed redox reactions in anoxic groundwater. *Environ. Sci. Technol.* **28**(7) : 1205-1210.
- Madigan, M. y Martinko, J. (editors). (2005). *Brock Biology of Microorganisms*, 11th ed., Prentice Hall.
- Mai, P., Jacobsen, O.S. y Aamand, J. (2001). Mineralization and co-metabolic degradation of phenoxyalkanoic acid herbicides by a pure culture isolated from an aquifer. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**:486-490.
- Marrón-Montiel, E., Ruiz-Ordaz, N., Rubio-Granados, C., Juárez-Ramírez, C. y Galíndez-Mayer, C.J. (2006). 2,4-D-degrading bacterial consortium isolation, kinetic characterization in batch and continuous cultura and application for bioaugmenting an activated sludge microbial community. *Process Biochemistry.* **41**:1521-1528.
- Milner, C.R. y Goulter, R. (1986). Comparative toxicity of chlorophenols, nitrophenols, and phenoxyalkanoic acids to freshwater bacteria. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **37**:714-718.
- Milligan, P.W. y Häggblom, M.H. (2001). Anaerobic degradation and dehalogenation of chlorosalicylates and salicylate under four reducing conditions. *Biodegradation.* **12**:159-167.
- Mogensen, A.S., Dolfing, J., Haagensen, F. y Ahring, B.K. (2003). Potential for anaerobic conversion of xenobiotics. En Sheper, T. (ed) *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol. 82. pp. 69-134.
- Mohn, W. y Tiedje J.M. (1992). Microbial reductive dehalogenation. *Microbiol. Rev.* **56**:482-507.
- Montalvo, S.M. y Guerrero, L.S. (editores). (2003). Tratamiento anaerobio de residuos. Producción de biogás. Chile. Universidad Técnica Federico Santa María. 416 pp.
- Munn, M.D., Gilliom, R.J., Moran, P.W., y Nowell, L.H., 2006, Pesticide toxicity index for freshwater aquatic organisms, 2nd Edition:U.S Geological Survey Scientific Investigations Report 2006-5148,81 p.
- Muyzer, G. y Stams, A.J.M. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Rev. Microbiol.* **6**:441-454.
- Nagpal, S., Chuichulcherm, S., Livingston, A. y Peeva, L. (2000). Ethanol utilization by sulfate-reducing bacteria: an experimental and modeling study. *Biotechnology and Bioengineering.* **70**(5):533-543.
- Öberg, G. (2002). The natural chlorine-fitting the scattered pieces. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**: 565-581.
- Olguin-Lora, P., Puig-Grajales, L. y Razo-Flores, E. (2003). Inhibition of acetoclastic methanogenic activity by phenol and *alkyl* phenols. *Environ. Tech.* (**24**):999-1006.

- O'Reilly, C. y Colleran, E. (2006). Effect of influent COD/SO₄²⁻ ratios on mesophilic anaerobic reactor biomass populations: physico-chemical and microbiological properties. *FEMS Microbiol. Ecol.* **56**: 141-153.
- Parales, R.E., Bruce, N.C., Schmid, A. y Wackett, L.P. (2002). Minireview : Biodegradation, biotransformation and biocatalysis. *Applied and Environmental Microbiology.* **68**(10):4699-4709.
- Pepelko, W.E., Gaylor, D.W. y Mukerjee, D. (2005). Comparative toxic potency ranking of chlorophenols. *Toxicol Ind Health* . **21**(3-4): 93-111.
- Rabhus, R., Hansen, T. A. y Widdel, F. (2006). Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes. En Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.Z. y Stackebrandt, E. (ed.). *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria. Vol. 2: Ecophysiology and Biochemistry.* Capítulo 1.22. pp 659–768.
- Reineke, W. (2001). Aerobic and Anaerobic Biodegradation Potentials of Microorganisms. Cap. 1 en *The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2, Parte K. Biodegradation and Persistence.* B. Beek, ed. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Alemania.
- Reyes, S. A. y Lettinga, G. (1991). The effect of aromatic structure on the inhibition of acetoclastic methanogenesis in granular sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 544-550.
- Rittman, B.E. y McCarty, P.L. (2001). *Environmental technology: Principles and applications.* Ed. McGraw Hill. Cap. 2. pp. 126-163.
- Robles-González, I., Ríos-Leal, E., Ferrera-Cerrato, R., Esparza-García, F., Rinderknecht-Seijas, N., Poggi-Varaldo H.M., (2006). Bioremediation of a mineral soil with high contents of clay and organic matter contaminated with herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using slurry bioreactors: Effect of electron acceptor and supplementation with an organic carbon source. *Process Biochemistry*, **41**:1951-1960.
- Sanford, R.A. y Tiedje, J. M. (1997). Chlorophenol dechlorination and subsequent degradation in denitrifying microcosms fed low concentrations of nitrate. *Biodegradation.* **7**: 425-434.
- Santegoeds, C.M., Ferdelman, T.G., Muyzer, G. y de Beer, D. (1998). Structural and functional dynamics of sulfate-reducing populations in bacterial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(10): 3731-3739.
- Shelton, D.R. y Tiedje, J.,M. (1984). Isolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**(4):840-848.
- Shieh, W.K. y Keenan, J.D. (1986). Fluidized Bed Biofilm Reactor for Wastewater Treatment. En Fiechter, A. (ed.). *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 33. pp. 131-169.
- Sikkema, J., de Bont, J.A.M. y Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews.* **59**(2): 201-222.
- Singh, K.S. y Viraraghavan, T. (1998). Start-up and operation of UASB reactors at 20°C for municipal wastewater treatment. *J. Ferment. Bioeng.* **85** (6): 609-614.
- Smejkal, C.W., Vallaeyts, T., Burton, S.K. y Lappin-Scott, H.M. (2001). A rapid method to screen degradation ability in chlorophenoxyalkanoic acid herbicide-degrading bacteria. *Letters in Applied Microbiology.* **32**:273-277.
- Smidt, H. y de Vos, W.M. (2004). Anaerobic microbial dehalogenation. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**:43-73.
- Speece R. E. (1996). *Anaerobic biotechnology for industrial wastewater.* Published by Archae Press. USA.
- Sun, B., Cole, J., Sanford, R. y Tiedje, J. (2000). Isolation and characterization of *Desulfovibrio dechloracetivorans* sp. nov., a marine dechlorating bacterium growing by coupling the oxidation of acetate to the reductive dechlorination of 2-chlorophenol. *Appl. Environ. Microb.* **66**(6):2408-2413.

- Steudel, R. (2000). The chemical sulfur cycle. En Lens, P.N.L. y Pol L.H. (ed.) Environmental technologies to treat sulfur pollution. Capitulo 1. pp: 1-31.
- Stringer, R. and Johnston, P. (2001) Chlorine and the Environment: An Overview of the Chlorine Industry. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Thauer, R.K., Stackbrandt, E. y Hamilton, W.A. (2007). Energy metabolism and phylogenetic diversity of sulphate-reducing bacteria. En Barton, L.L. y Hamilton, W.A. (ed). Sulphate-Reducing Bacteria: Environmental and Engineered Systems. Capitulo 1. pp. 1-37.
- Thorstensen, C.W. y Lode, O. (2001). Organic compounds in the environment: laboratory degradation studies of bentazone, dichlorprop, MCPA and propiconazole in Norwegian soils. *J. Environ. Qual.* **30**:947-953.
- Townsend, G.T., Ramanand, K. y Suflita, J.M. (1997). Reductive dehalogenation and mineralization of 3-chlorobenzoate in the presence of sulfate by microorganisms from a methanogenic aquifer. *Appl. Environ. Microb.* **63**(7):2785-2791.
- Uberoi, V. y Bhattacharya, S.(1997). Effects of chlorophenols and nitrophenols on the kinetics of propionate degradation in sulfate-reducing systems. *Environ. Sci. Technol.* **31**: 1607-1614.
- Vacca, V.J., Rincon, N., Colina, G., Marín, J., Díaz, A., Behling, E., Chacín, E. y Fernández, N. (2008). Anaerobic treatment for the removal of phenolic compounds and saturated hydrocarbons. *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia.* **31**(3): 225-233.
- Vallecillo, A., García-Encina, P.A. y Peña, M. (1999). Anaerobic biodegradability and toxicity of chlorophenols. *Wat. Sci. Tech.* **40**(8):161-168.
- van Peé, K., H. y Unversucht, S. (2003). Biological dehalogenation and halogenation reactions: Review. *Chemosphere*, **52**: 299-312.
- Visser, A. (1995). The anaerobic treatment of sulfate containing wastewater. Ph.D. Thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, Holanda.
- Wall, J.D, Arkin, A.P., Balci, N.C. y Rapp-Giles, B. (2008). Genetics and genomics of sulfate respiration in *Desulfovibrio*. En Dahl, C. y Friedrich, C.G. (ed.). Microbial sulfur metabolism. Capitulo 1. pp. 1-12.
- Wang, A., Ren, N., Wang, X. y Lee, D. (2008). Enhanced sulfate reduction with acidogenic sulfate-reducing bacteria. *J. of Hazardous Materials.* **154**: 1060-1065.
- WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard (2001), Ginebra, Suiza.
- Widdel, F. (1988). Microbiology and ecology of sulfate-reducing bacteria in: Biology of Anaerobic Microorganisms (AJB Zhender ed.), John Wiley & Sons, New York, 469-585.
- Ye, F.X. y Shen, D.S. (2004). Acclimation of anaerobic sludge degrading chlorophenols and the biodegradation kinetics during acclimation period. *Chemosphere.* **54**: 1573-1580.
- Young, A.L. (2006). Enhanced co-metabolism of TCCD in the presence of high concentrations of phenoxy herbicides. *Environ. Sci. & Pollut. Res.* **13**(3) :149-150.
- Zhang, C. y Bennett, G.N. (2005). Biodegradation of xenobiotics by anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**:600-618.
- Zipper, C., Bollinger, C., Fleischmann, T., Suter, M. J.-F., Angst, W., Müller, M.D. y Kohler, H.-P.E. (1999). Fate of the herbicides mecoprop, dichloprop and 2,4-D in aerobic and anaerobic sewage sludge as determined by laboratory batch studies and enantiomers-specific analysis. *Biodegradation.* **10**:271-278.

Citas Electrónicas

HSDB (Hazardous Substances Data Bank). (<http://toxnet.nlm.nih.gov>)

INEGI, 2008. (Instituto Nacional de Estadística y Geográfica). (http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/sociodemografico/Quimica/2008/IQM-2008.pdf).

INCHEM (<http://www.inchem.org>)

IARC(International Agency for Research on Cancer) (<http://www.iarc.fr>)

EXTOXNET (Extension Toxicology Network) (<http://pmep.cce.cornell.edu>)

MSDS (Material Safety Data Sheet) (<http://msds.chem.ox.ac.uk>)

Referencia de la U.S. EPA (<http://www.gpoaccess.gov/ecfr>):

2-clorofenol, 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol : 40 CFR 261.33 (USEPA); U.S. National Archives and Records Administration's Electronic Code of Federal Regulations. Available from, as of October 24, 2008.

Ácido 2,4-diclorofenoxiácético: 40 CFR 180.142(a)(13)(iii) (7/1/2001).

Norma Mexicana (NOM) SEMARNAT:

<http://www.semarnat.gob.mx/leyesynormas/normas/Pages/normasoficialesmexicanasvigentes.aspx>

VIII. Anexos

A1. Formación de biopelícula en el reactor LFFD

Para la formación de biopelícula se operó el reactor LFFD bajo las condiciones descritas en el apartado 2.1.3 de materiales y métodos. Se alcanzó una concentración de biomasa constante en el día 17 como se muestra en la Figura A.1.

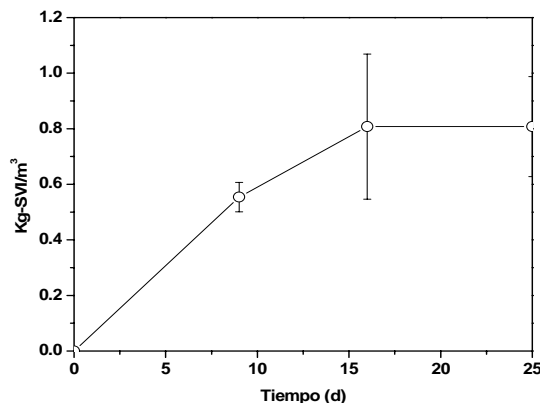


Figura A.1. Perfil de formación de biopelícula en el reactor LFFD.

A2. Operación en continuo del reactor LFFD

Después de que la concentración de biomasa fue constante el reactor LFFD se operó en continuo (Figura 8.2) en donde se alcanzó el estado estacionario a partir del día 15. Posteriormente se utilizaron las partículas del reactor para realizar los ensayos de toxicidad.

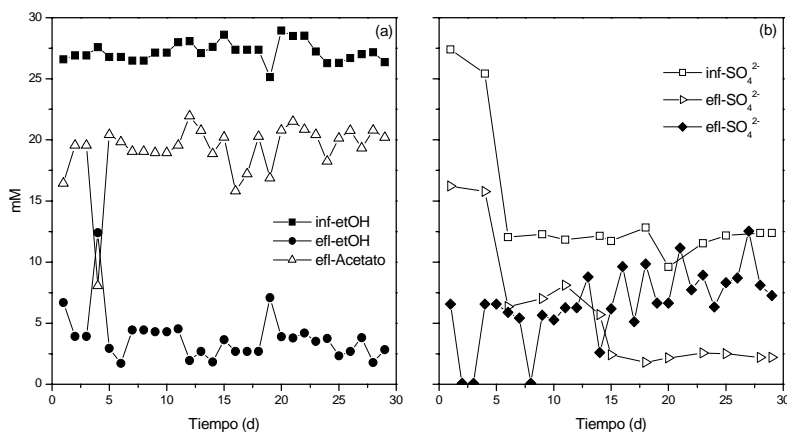


Figura 8.2. Perfil de consumo de compuestos carbonados (a) y azufrados (b) durante la operación en continuo del reactor LFFD.

A3. Preparación de buffer de acetatos a una concentración de 0.05 M y un pH de 4.5

Para la preparación del buffer de acetatos se empleo la ecuación de Henderson-Hasselbalch.

$$pH = pKa + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (\text{ec. 8.1})$$

Datos ácido acético:

$$pH = 4.5$$

$$pKa = 4.76$$

$$[\text{Acetato}] = 0.05 \text{ M}$$

Sustituyendo en la ec. 8.1 y resolviendo.

$$4.5 = 4.76 + \log \frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]} \quad \therefore \quad \log \frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]} = -0.26$$

Elevando por 10^x ambas partes de la ecuación.

$$\frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]} = 0.5495 \quad (\text{ec. 8.2})$$

$$\text{Suponiendo que } [\text{CH}_3\text{COO}^-] + [\text{CH}_3\text{COOH}] = 0.05 \text{ M} \quad (\text{ec. 8.3})$$

Despejando el acetato de la ec. 8.2 y sustituyendo en la ec. 8.3

$$0.5495 [\text{CH}_3\text{COOH}] + [\text{CH}_3\text{COOH}] = 0.05 \text{ M}$$

Resolviendo

$$[\text{CH}_3\text{COOH}] = 0.0322 \text{ M, este valor se sustituye en la ec. 8.3.}$$

$$[\text{CH}_3\text{COO}^-] = 0.0178 \text{ M}$$

A4. Preparación de soluciones

Cuantificación de SO_4^{2-} por método turbidimétrico.

Mezcla de reacción: mezclar 50 mL de glicerol con una solución que contenga 30 mL de HCl concentrado, 300 mL de agua destilada, 100 mL de alcohol isopropílico o etílico al 95% y 75 g de NaCl.

Solución estándar de sulfato (100 mg/L): disolver 147.9 mg de Na_2SO_4 anhidro en 1000 mL de agua destilada, realizar las diluciones necesarias para la curva patrón.

Procedimiento: Colocar 50 mL de muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Agregar 5 mL de mezcla de reacción. Agitar. Mientras la solución esta agitándose, añadir 0.5 g de cloruro de

bario, dejar agitar durante 1 min. Registrar la absorbancia a 420 nm, durante los primeros cuatro minutos. Tomar la lectura que sea mayor y obtener la concentración de la curva estándar corrigiendo por el factor de dilución. En este caso se utilizó un espectro marca Spectronic 20D⁺ con lámpara de tungsteno.

Soluciones para las curvas de calibración de carbono total (CT) y carbono inorgánico.

Para la curva de CT se utilizó una solución de biftalato de potasio a una concentración de 2.125 g/L (aprox. 1000 mg/L de C-orgánico). Antes de preparar la solución, el biftalato se secó en una estufa entre 105-120°C por una hora y posteriormente se dejó enfriar en un desecador.

Para la curva de CI se prepararon dos soluciones, una de bicarbonato de sodio a 3.5 g/L y otra de carbonato de sodio a 4.41 g/L, entre ambas soluciones hay una concentración aproximada de 1000 mg/L de carbono inorgánico. Antes de preparar las soluciones, el bicarbonato se dejó secar por 2 horas en un desecador y el carbonato se secó en una estufa a 280-290°C por una hora y después se dejó enfriar en un desecador.

El intervalo de concentración para los estándares de CT y CI fue de 100 -1000 mg/L de carbono.

Reactivos para la cuantificación de sulfuro.

Reactivo de cobre: consiste en HCl (50 mM) y CuSO₄ (5 mM): Para determinar la concentración de S²⁻ en el reactor se tomó un volumen determinado del efluente, del cual se filtró 1mL utilizando filtros con tamaño de poro de 0.45 µm (Pall, AP-4498) para posteriormente tomar 100 µL y adicionarlos a una celda espectrofotométrica, la cual contenía 4 mL del reactivo de cobre, se mezcló en un vórtex e inmediatamente y se determinó la absorbancia de la muestra a 480 nm en un espectrofotómetro. El blanco consistió solamente de reactivo de cobre.

A5. Modelo de Gompertz, cálculo de la q_{max} y de la concentración inhibitoria (CI₅₀).

Explicación del uso del modelo de Gompertz

El modelo sigmoidal Gompertz es utilizado en biología, botánica, zoología y ecología para describir el crecimiento de plantas, árboles, microorganismos, animales y seres humanos cuyo comportamiento se caracteriza por curvas en forma en "S", es decir, que incrementan su tasa de cambio monótonamente a partir de un punto fijo hasta alcanzar un punto de inflexión después del cual la tasa de cambio decrece

hasta aproximarse asintóticamente a un valor final. Otra característica es que no son simétricas con respecto a su punto de inflexión (Ratkowsky, 1983).

El modelo Gompertz está dado por la siguiente ecuación:

$$y(t) = ae^{-b^{-kt}} \quad \text{ec. 8.4}$$

Donde, $y(t)$ y t son las variables y a , b y k son los parámetros del modelo.

Derivando la Ecuación A2.1 se obtiene la tasa de cambio de la variable y .

$$\frac{dy}{dt} = k \cdot y \cdot b \cdot e^{kt} \quad \text{ec. 8.5}$$

El término b^{-kt} puede escribirse en términos de “ y ” mediante la siguiente igualdad:

$$b^{-kt} = \log_e \left(\frac{a}{y} \right) \quad \text{ec. 8.6}$$

Por lo tanto la Ecuación 8.5 puede escribirse de la siguiente manera:

$$\frac{dy}{dt} = k \cdot y \cdot \log_e \left(\frac{a}{y} \right) \quad \text{ec. 8.7}$$

La segunda derivada de la Ecuación 8.5 permite identificar la velocidad de cambio de la tasa de cambio de y :

$$\frac{d^2y}{dt^2} = k \cdot a \cdot e^{(-b \cdot e^{-kt})} \cdot (b \cdot e^{-kt})^2 - k \cdot a \cdot e^{(-b \cdot e^{-kt})} \cdot b \cdot e^{-kt} \quad \text{ec. 8.8}$$

La Ecuación 8.8 se puede escribir en términos de la siguiente manera:

$$\frac{d^2y}{dt^2} = k \cdot \left(\log_e \frac{a}{y} - 1 \right) \frac{dy}{dt} \quad \text{ec. 8.9}$$

En el punto de inflexión de la curva dy/dt es máxima y la Ecuación 8.9 es cero, por tanto:

$$\log_e \left(\frac{a}{y} \right) = 1 \quad \Rightarrow y = a/e \quad \text{ec. 8.10}$$

La tasa máxima se obtiene evaluando la Ecuación 8.7 para $y = a/e$.

$$V_{\max} = \left. \frac{dy}{dt} \right|_{y=a/e} = k \left(\frac{a}{e} \right) \log_e \left(\frac{a}{a/e} \right) = k \frac{a}{e} = 0.368 \cdot a \cdot k \quad \text{ec. 8.11}$$

Si t_c es el tiempo al que se alcanza el punto de inflexión y la tasa máxima de consumo (producción) entonces, el punto de inflexión tiene las coordenadas $(t_c, a/e)$. La siguiente relación de los parámetros b y k permite calcular t_c

$$t_c = \frac{(\ln b)}{k} \quad \text{ec. 8.12}$$

Al ser un modelo empírico, el modelo no considera la reducción en la tasa por la reducción de la concentración de sustrato. En este sentido es considerado como una relación de orden cero. Además, el valor de K (h^{-1}) es independiente de la cantidad de muestra utilizada. El ajuste de datos experimentales de consumo de sustratos o producción de metabolitos con este modelo reduce el error al tratar de ajustar con una línea. A pesar de que el modelo Gompertz no tiene un enfoque fenomenológico, es posible asociar los valores de las constantes a tasas de consumo observadas experimentalmente (Ortiz López 2004).

En este trabajo, el modelo Gompertz es utilizado como una herramienta matemática para ajustar los datos experimentales de la producción de ácido láctico y acetato, a fin de obtener los parámetros a y k que permitan predecir un valor de tasas de producción o consumo máximas.

Los parámetros cinéticos obtenidos del modelo Gompertz se ha utilizado en diversos campos como en: crecimiento demográfico, crecimiento de poblaciones, biología (Piantanelli, 1986). El modelo Gompertz también ha sido usado para describir el crecimiento microbiano en procesos de

fermentación asociando a los tres parámetros del modelo las tres fases, del crecimiento microbiano: la de aclimatación, la logarítmica y la estacionaria (Simon and Karim, 2001).

A6. Cálculos estadísticos de ANOVA

Análisis de ANOVA en la comparación de los reactores LFFD y UASB.

Analysis of Variance Report

Page/Date/Time 1 11/07/2011 12:10:11 p.m.

Database

Response consumo

Expected Mean Squares Section

Source	Term	DF	Term Fixed?	Denominator Term	Expected Mean Square
A: etapa		2	No	S(AB)	S+bsA
B: reactores		1	Yes	S(AB)	S+asB
S(AB)		70	No		S

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

Analysis of Variance Table

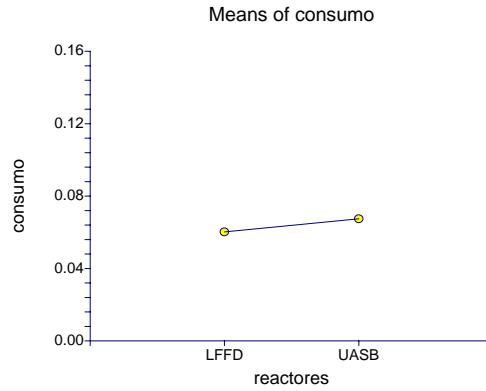
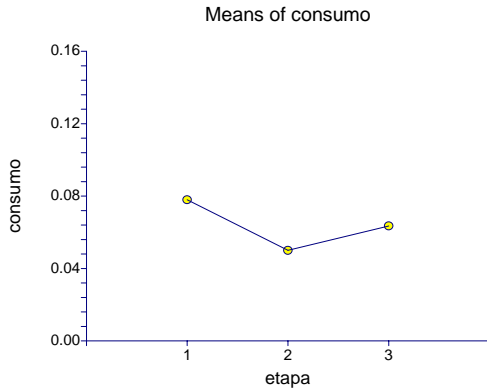
Source	Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: etapa		2	0.010515	0.0052575	7.37	0.001248*	
B: reactores		1	9.851351E-04	9.851351E-04	1.38	0.243985	0.212454
S		70	4.994987E-02	7.135695E-04			
Total (Adjusted)		73	0.06145				
Total		74					

* Term significant at alpha = 0.05

Means and Standard Error Section

Term	Count	Mean	Standard Error
All	74	6.383333E-02	
A: etapa			
1	30	0.078	4.877053E-03
2	24	0.05	5.452712E-03
3	20	0.0635	5.973146E-03
B: reactores			
LFFD	37	6.018468E-02	4.391544E-03
UASB	37	6.748198E-02	4.391544E-03

Plots Section



Analysis of Variance Report

Page/Date/Time 2 11/07/2011 12:10:11 p.m.
 Database
 Response consumo

Duncan's Multiple-Comparison Test

Response: consumo
 Term B: reactores

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=70 MSE=7.135695E-04

Group	Count	Mean	Different From Groups
LFFD	37	6.018468E-02	
UASB	37	6.748198E-02	

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: consumo
 Term B: reactores

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=70 MSE=7.135695E-04 Critical Value=2.82057

Group	Count	Mean	Different From Groups
LFFD	37	6.018468E-02	
UASB	37	6.748198E-02	

Planned Comparison: B Linear Trend

Response: consumo
 Term B: reactores

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=70 MSE=7.135695E-04

Comparison Value=5.159969E-03 T-Value=1.174978 Prob>|T|=0.243985 Decision(0.05)=Accept
 Comparison Standard Error=4.391544E-03

Group	Comparison Coefficient	Count	Mean
-------	------------------------	-------	------

LFFD	-0.7071068	37	6.018468E-02
UASB	0.7071068	37	6.748198E-02

Análisis de ANOVA para los reactores R1 y R2.

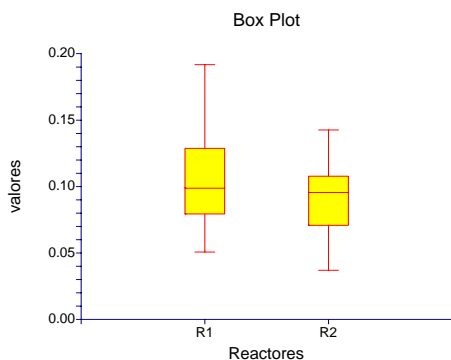
Analysis of Variance Report

Page/Date/Time 1 09/08/2011 07:34:29 p.m.
 Database
 Response valores

Tests of Assumptions Section

Assumption	Test Value	Prob Level	Decision (0.05)
Skewness Normality of Residuals	1.5530	0.120433	Accept
Kurtosis Normality of Residuals	0.5709	0.568069	Accept
Omnibus Normality of Residuals	2.7376	0.254411	Accept
Modified-Levene Equal-Variance Test	0.4383	0.510269	Accept

Box Plot Section



Expected Mean Squares Section

Source	Term	DF	Term Fixed?	Denominator Term	Expected Mean Square
A: Reactores		1	Yes	S(A)	S+sA
S(A)		65	No		S(A)

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

Analysis of Variance Table

Source	Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Reactores		1	1.082983E-03	1.082983E-03	1.26	0.265834	0.197602
S(A)		65	5.588083E-02	8.59705E-04			
Total (Adjusted)		66	5.696381E-02				
Total		67					

* Term significant at alpha = 0.05

Analysis of Variance Report

Page/Date/Time 2 09/08/2011 07:34:29 p.m.
 Database
 Response valores

Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on Ranks

Hypotheses

Ho: All medians are equal.

Ha: At least two medians are different.

Test Results

Method	DF	Chi-Square (H)	Prob Level	Decision(0.05)
Not Corrected for Ties	1	0.4757785	0.490341	Accept Ho
Corrected for Ties	1	0.475826	0.490319	Accept Ho
Number Sets of Ties	5			
Multiplicity Factor	30			

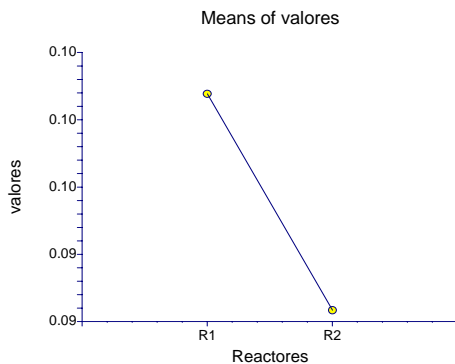
Group Detail

Group	Count	Sum of Ranks	Mean Rank	Z-Value	Median
R1	34	1211.00	35.62	0.6898	9.927161E-02
R2	33	1067.00	32.33	-0.6898	9.606497E-02

Means and Effects Section

Term	Count	Mean	Standard Error	Effect
All	67	9.650059E-02		2.878823E-03
A: Reactores				
R1	34	0.1004615	5.028463E-03	9.758265E-02
R2	33	9.241969E-02	5.104084E-03	8.954087E-02

Plots of Means Section



Analysis of Variance Report

Page/Date/Time 3 09/08/2011 07:34:29 p.m.
 Database
 Response valores

Duncan's Multiple-Comparison Test

Response: valores
 Term A: Reactores

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=65 MSE=8.59705E-04

Group	Count	Mean	Different From Groups
R2	33	9.241969E-02	
R1	34	0.1004615	

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: valores
Term A: Reactores

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=65 MSE=8.59705E-04 Critical Value=2.82439

Group	Count	Mean	Different From Groups
R2	33	9.241969E-02	
R1	34	0.1004615	

Publicación y Presentaciones en congreso derivadas de esta tesis

- García, C.U., Celis, L.B, Poggí, H. y Meraz, M. (2010). Inhibitory concentrations of 2,4D and its possible intermediates in sulfate reducing biofilms. *J. Hazard. Mater.* **179**:591-595.
- 2-chlorophenol toxicity and degradation capacity of sulfate reducing biofilms (oral). Presentado en 12th World Congress on Anaerobic Digestion (AD12). Guadalajara, Jalisco, México. 31-octubre al 4-noviembre 2010.
- Effect of the COD/SO₄ ratio in the removal of 2-chlorophenol sulphate reducing biofilms (poster). Presentado en 12th World Congress on Anaerobic Digestion (AD12). Guadalajara, Jalisco, México. 31-octubre al 4-noviembre 2010.
- Inhibitory Effect of 2-Chlorophenol on Sulfate-Reducing Suspended Biomass and Biofilm Reactors (poster). Presentado en Seventh International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. Monterey, California. 24-27 mayo de 2010.
- Toxicidad de clorofenoles sobre biopelícula sulfato-reductora (poster). Presentado en XIII congreso Nacional de Biotecnología y bioingeniería Acapulco, México, Junio 2009.
- Toxicidad de Clorofenoles sobre Sulfato-Reducción (oral). Presentado en IX Taller y Simposio Latinoamericano de Digestión Anaerobia. Isla de Pascua, Chile. 19-23 de octubre de 2008.