



**Casa abierta al tiempo**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
IZTAPALAPA**

**DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA  
SALUD**

**EFFECTO DE LAS QUINONAS EN LA OXIDACIÓN  
ANAEROBIA DE MATERIA ORGANICA RECALCITRANTE  
POR UN LODO DESNITRIFICANTE**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN  
BIOTECNOLOGIA**

**P R E S E N T A**

**ARTURO CADENA RAMIREZ**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. JORGE GOMEZ HERNANDEZ**

**MEXICO D.F. DICIEMBRE 2004**

**Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fisiología Microbiana  
del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma  
Metropolitana, Unidad Iztapalapa.**

***La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma  
Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Postgrado del  
CONACYT.***

***Registro 0471-O.***

## **Agradecimientos**

Agradezco la dirección conjunta del Dr. J. Gomez Y de la Dra. Anne-Claire Texier durante la realización y evaluación de este trabajo de tesis.

Al Dr. Jorge Gómez Hernández, por haberme recibido en el laboratorio. Por la dirección de este trabajo en aquellas interminables horas de discusión y análisis crítico de los resultados y principalmente por haber sido la persona que me introdujo en el mundo de la fisiología microbiana.

A la Dra. Anne Claire Texier, por haber escuchado simple mis ideas locas, por su incomparable apoyo y profunda paciencia. Por ayudarme en la estructuración de este trabajo de tesis.... Anne sin tú ayuda no hubiera podido transmitir mis ideas.

Al Dr. Ignacio González (Nacho), por su intervención oportuna y apoyo para la complementación de este trabajo.... Nacho gracias por enseñarme las bellezas de la electroquímica y sobre todo, el apoyo que siempre me brindaste.

A la Dra. Carmen Fajardo Ortiz, del Laboratorio Analítico General del posgrado, por su ayuda en la parte de métodos analíticos.

A Dora, Nora, Yára, Román y Víctor del Laboratorio de Electroquímica (R-109) por su apoyo. A Juan Carlos Maya, por haberme invitado a acercarme a la electroquímica y a conocer a Nacho.

A Fernanda, Alejandro, Armando, Sergio, Ricardo, Flor y Felipe, compañeros y amigos del Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Microbiana (W103), por compartir su experiencia conmigo, y esa amistad que permitió que las jornadas de trabajo fueran más amenas.

A CONACyT, que financió el proyecto "Evaluación de la nitrificación/desnitrificación en la eliminación de nitrógeno, azufre y compuestos recalcitrantes del agua" (No convenio: SEP-2003-CO2-43144/A-1).

Al Dr. Ernesto Favela Torres y al Posgrado en Biotecnología de la UAM Iztapalapa por el apoyo brindado para la impresión de este trabajo de Tesis.

---

## INDICE

<b>RESUMEN</b>		<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b>		<b>ii</b>
<b>1. INTRODUCCION</b>		<b>1</b>
1.1	PANORAMA ACTUAL	2
1.2	TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES	3
1.3	ELIMINACIÓN DE NITRÓGENO	4
1.3.1	El Ciclo del Nitrógeno	5
1.3.2	Eliminación Biológica de Nitrógeno por Desnitrificación	6
1.3.2.1	Microbiología de la Desnitrificación	7
1.3.2.2	Bioquímica de la Desnitrificación	8
1.3.2.3	Factores que afectan la Desnitrificación	9
1.3.3	Desnitrificación y Oxidación de Materia Orgánica	10
1.4	LAS SUBSTANCIAS HÚMICAS	12
1.4.1	El humus	12
1.4.2	Papel de las Substancias Húmicas en los Procesos Biogeoquímicos	13
<b>2. OBJETIVOS</b>		<b>16</b>
2.1	OBJETIVO GENERAL	17
2.2	OBJETIVOS PARTICULARES	17
<b>3. MATERIALES Y METODOS</b>		<b>18</b>
3.1	ESTABILIZACIÓN DEL REACTOR CONTINUO DESNITRIFICANTE EN ESTADO ESTACIONARIO	19
3.1.1	Descripción del reactor	19
3.1.2	Inóculo	20
3.1.3	Medio de cultivo	20
3.1.4	Reactor en estado estacionario	21
3.2	PRUEBAS EN LOTE	21
3.2.1	Medio de Cultivo	22
3.2.2	Preparación del inóculo	23

---

3.3	MÉTODOS DE ANÁLISIS	24
3.3.1	Cuantificación de Nitrato y Nitrito	24
3.3.2	Acetato	25
3.3.3	Análisis de los gases: N <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> O, CH <sub>4</sub> , CO <sub>2</sub>	26
3.3.4	Cuantificación de amonio	28
3.3.5	Carbono orgánico e inorgánico	28
3.3.6	Sólidos suspendidos volátiles	29
3.3.7	<i>p</i> -Cresol	30
3.3.8	Determinación de la quinona	32
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b>	<b>35</b>
4.1	OBTENCIÓN DEL INÓCULO DESNITRIFICANTE FISIOLÓGICAMENTE ESTABLE PARA LAS CINÉTICAS EN LOTE	36
4.1.1	Estabilización del lodo bajo condiciones desasimilativas	36
4.1.2	Crecimiento del lodo como fuente de inóculo	38
4.2	ESTUDIO EN LOTE DEL EFECTO DE LA AQDS EN LA OXIDACIÓN DE MO POR UN LODO DESNITRIFICANTE	39
4.2.1	Oxidación de materia orgánica con quinonas	39
4.2.1.1	Nitrato como aceptor final de electrones	39
4.2.1.2	AQDS como aceptor final de electrones	42
4.2.1.3	AQDS versus Nitrato como potenciales oxidantes	50
4.2.2	Efecto de la quinona en la oxidación de MO durante el proceso desnitificante	52
4.2.2.1	La AQDS en la desnitificación con acetato	52
4.2.2.2	La AQDS en la desnitificación con un compuesto recalcitrante	56
4.2.2.3	El efecto de otros tipos de quinonas	58
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>62</b>
<b>6.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>65</b>

---

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Géneros bacterianos con capacidad desnitrificante (Cuervo, 2003).	7
<b>Tabla 2.</b> Compuestos que se mencionan ser oxidados bajo condiciones desnitrificantes.	11
<b>Tabla 3.</b> Composición del medio de cultivo	20
<b>Tabla 4.</b> Estequiometría y cambios de energía libre estandar ( $\Delta G^\circ$ ) para el acetato y el p-cresol.	22
<b>Tabla 5.</b> Estimadores de los componentes de las curvas de calibración para $\text{NO}_2^-$ y $\text{NO}_3^-$	25
<b>Tabla 6.</b> Estimadores de los componentes de las curvas de calibración para el acetato.	26
<b>Tabla 7.</b> Estimadores de los componentes de las curvas de calibración para el amonio.	28
<b>Tabla 8.</b> Estimadores de los componentes de las curvas de calibración para carbono orgánico total e inorgánico.	29
<b>Tabla 9.</b> Estimadores de los componentes de las curvas de calibración para el p-cresol.	31
<b>Tabla 10.</b> Velocidades de carga y descarga, rendimientos y eficiencias de consumo en el reactor continuo desnitrificante.	37
<b>Tabla 11.</b> Velocidades específicas de consumo de p-cresol y acetato, con nitrato como aceptor final de electrones	42
<b>Tabla 12.</b> Potenciales de oxido-reducción de la AQDS/AH <sub>2</sub> QDS a diferentes valores de pH.	45
<b>Tabla 13.</b> Velocidades específicas de consumo de carbono de p-cresol y de acetato, con AQDS como aceptor final de electrones.	48
<b>Tabla 14.</b> Velocidades específicas de consumo de acetato y de nitrato en cultivos desnitrificantes con y sin quinona.	54
<b>Tabla 15.</b> Velocidades específicas de consumo de acetato (500 mg C/L) y de nitrato en cultivos desnitrificantes con y sin quinona (AQDS).	55
<b>Tabla 16.</b> Potenciales de óxido/reducción de las quinonas utilizadas en los ensayos de oxidación anaerobia de p-cresol.	61

---

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo del Nitrógeno según Richardson y Watmough (1999).	5
<b>Figura 2.</b> Posible ruta de inicio de la desnitrificación.	8
<b>Figura 3.</b> Reducción del nitrato en un proceso desnitrificante	8
<b>Figura 4.</b> La 2,6 Disulfonato de antraquinona	13
<b>Figura 5</b> Acoplamiento de un proceso respiratorio de oxidación anaerobia de materia orgánica con la desnitrificación mediado por quinonas.	15
<b>Figura 6.</b> Esquema del reactor continuo desnitrificante de tanque agitado.	19
<b>Figura 7.</b> Curvas de calibración de nitrato y nitrito , obtenidas por electroforesis capilar.	25
<b>Figura 8.</b> Curvas de calibración nitrógeno atmosférico obtenidas por cromatografía de gases.	27
<b>Figura 9.</b> Voltamperograma de la AQDS (10 mM) en medio basal.	32
<b>Figura 10.</b> Sistema para medir la AH <sub>2</sub> QDS en cultivos desnitrificantes	33
<b>Figura 11 .</b> Voltamperogramas a diferentes concentraciones de AQDS en el medio basal desnitrificante.	34
<b>Figura 12 .</b> Corriente contra concentración de AQDS.	34
<b>Figura 13.</b> Perfil de las velocidades de carga y descarga de los compuestos nitrogenados en el reactor continuo desnitrificante.	36
<b>Figura 14.</b> Perfil de las velocidades de carga y descarga de los compuestos carbonados en el reactor continuo desnitrificante.	37
<b>Figura 15.</b> Ensayos con nitrato como aceptor final de electrones.	40
<b>Figura 16.</b> Voltamperogramas del medio de cultivo desnitrificante con diferentes combinaciones de los componentes de interés: nitrato, acetato y AQDS.	43
<b>Figura 17.</b> Voltamperogramas del medio de cultivo con AQDS en presencia de lodo.	44
<b>Figura 18.</b> Voltamperogramas del medio de cultivo desnitrificante, en presencia de quinona y en presencia de quinona con nitrito.	45
<b>Figura 19.</b> Voltamperogramas de la AQDS en el medio de cultivo desnitrificante a diferentes valores de pH.	46
<b>Figura 20.</b> Cinéticas de oxidación de MO por un lodo desnitrificante con AQDS como aceptor final de electrones.	48
<b>Figura 21.</b> Velocidades específicas de consumo del acetato y de p-cresol por un lodo desnitrificante con diferentes aceptores de electrones.	50

---

<b>Figura 22.</b> Comparación de los perfiles de consumo y de producción de los compuestos carbonados y nitrogenados, en cultivos desnitrificantes en ausencia y en presencia de AQDS.	53
<b>Figura 23.</b> Perfiles de consumo y producción de los componentes nitrogenados y carbonados en cultivos desnitrificantes con acetato (500 mgC/L) y nitrato, en presencia y ausencia de AQDS.	54
<b>Figura 24.</b> Perfiles de consumo y producción de compuestos nitrogenados y carbonados en cultivos desnitrificantes con p-cresol y nitrato en presencia y ausencia AQDS.	57
<b>Figura 25.</b> Estudio cinético de la oxidación del p-cresol bajo condiciones desnitrificantes, en presencia de diferentes tipos de quinonas.	59

---

## RESUMEN

**EFFECTO DE LA QUINONA EN LA OXIDACION ANAEROBIA DE MATERIA ORGANICA RECALCITRANTE POR UN LODO DESNITRIFICANTE.** Tesis de maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa (2004). Cadena Ramírez Arturo.

En la actualidad un problema ambiental es la contaminación del agua que se da por el desmedido crecimiento poblacional, una práctica agrícola intensiva y una indiscriminada actividad industrial. Una propuesta factible para el tratamiento de las aguas que contienen nitrógeno en forma de nitrato y materia orgánica de diferentes tipos es la desnitrificación biológica. La desnitrificación es un proceso de tipo anóxico que acopla la oxidación de materia orgánica con la reducción de nitrato, lo que la hace amigable con el ambiente. Sin embargo, un paso limitante es la velocidad con la que se lleva a cabo. Este problema se acentúa más cuando participan compuestos orgánicos de tipo recalcitrante. Son varios los factores que afectan a la velocidad desnitrificante. Uno de ellos es el transporte de electrones entre los procesos de oxidación y reducción, que puede ser lento, originando con ello una disminución en la velocidad del proceso.

Se ha encontrado que las sustancias húmicas, la materia orgánica presente en todos los suelos, contienen quinonas, que les confieren propiedades redox. Por lo cual se han utilizado en cultivos microbianos como transportadores, aceptores finales o donadores de electrones en procesos de eliminación de compuestos de interés ecológico.

En el presente trabajo se estudió el efecto de la adición de una quinona modelo (AQDS) al proceso desnitrificante. Se realizaron ensayos en lote con un lodo desnitrificante de origen heterotrófico, el cual provenía de un reactor continuo de tanque agitado en estado estacionario. Primero con la quinona como aceptor final de electrones y dos tipos de materia orgánica (acetato y *p*-cresol como compuesto recalcitrante). Ambos compuestos orgánicos fueron totalmente oxidados a  $\text{HCO}_3^-$  ( $Y_{\text{HCO}_3^-} \approx 1$ ) con la AQDS, la cual se recuperó como  $\text{AH}_2\text{QDS}$ . Tanto el acetato como el *p*-cresol tuvieron eficiencias de consumo cercanas al 100%, pero las velocidades de oxidación fueron menores que con nitrato como potencial oxidante. El lodo desnitrificante fue capaz de utilizar a la AQDS como aceptor final de electrones para la oxidación de materia orgánica.

Se adicionó la AQDS al proceso desnitrificante en presencia de nitrato y materia orgánica. La quinona incrementó la velocidad de oxidación del acetato (500 mg/L) un 43% y un 17% la reducción de nitrato. Con el *p*-cresol se redujo la fase de retardo de oxidación cuando estuvo presente la quinona con respecto al control sin quinona. También pasó lo mismo con el nitrato. Los resultados dan indicios de que la quinona induce la formación de intermediarios de oxidación del *p*-cresol aunque al final todo el *p*-cresol se recuperó en forma de  $\text{HCO}_3^-$  ( $Y_{\text{HCO}_3^-} \approx 1$ ). El nitrito formado se recuperó con  $\text{N}_2$  al final del ensayo ( $Y_{\text{N}_2} \approx 1$ ). Las eficiencias de consumo de acetato como de *p*-cresol en presencia de la AQDS fueron del 100%, en ambos casos. Aquí, por primera vez se presenta evidencia de la participación de la AQDS como transportador de electrones en la oxidación de materia orgánica bajo condiciones desnitrificantes.

Se probaron otras quinonas en la oxidación de *p*-cresol con nitrato, la alizarina y la menadiona. En presencia de alizarina la oxidación del *p*-cresol fue más rápida que con la AQDS, con un rendimiento alto en la producción de  $\text{HCO}_3^-$  ( $Y_{\text{HCO}_3^-} \approx 1$ ), mientras que la desnitrificación se vio afectada ( $Y_{\text{N}_2} = 0.45$ ). La menadiona inhibe la oxidación completa del *p*-cresol a  $\text{CO}_2$  ( $Y_{\text{HCO}_3^-} = 0.5$ ) pero no inhibe la reducción de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{N}_2$  ( $Y_{\text{N}_2} \approx 1$ ). Diferentes quinonas, caracterizadas por un potencial de oxido-reducción, provocaron un efecto metabólico significativamente diferente sobre la oxidación del *p*-cresol como sobre la reducción de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{N}_2$ .

---

## ABSTRACT

**EFFECT OF THE QUINONES IN THE ANAEROBIC OXIDATION OF RECALCITRANT ORGANIC MATTER BY A DENITRIFYING SLUDGE.** Masters Thesis in Biotechnology. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa (2004). Cadena Ramírez Arturo.

Nowadays an environmental problem is the contamination of the water that is given by the limitless population growth, an intensive agricultural practice and a high industrial activity. A feasible proposal for the treatment of the wastewater that contain nitrogen in nitrate form and organic matter of different kinds is the biological denitrification. The denitrification is an anoxic process that couples the oxidation of organic matter to  $\text{CO}_2$  with the nitrate reduction to dinitrogen; this characteristic makes it friendly with the environment. However, a restrictive step is the rate with which is carried out. This problem is more accentuated when recalcitrant organic compounds participate. There are several factors that affect the denitrification rate. One of them is the electron transport among the processes of oxidation and reduction that it can be slow, originating what it, a decrease in the denitrifying process rate.

It was found that humic substances, the most abundant organic fraction in the biosphere, contain quinone moieties that confer them redox properties. For this reason, they have been used in microbial cultures as redox mediators, terminal electron acceptor or electron donors for the elimination processes of ecologically important substrates.

Presently work was studied the effect of the addition of a quinone model (AQDS) to the denitrifying process. Assays were carried out in batch mode culture with a denitrifying sludge from a continuous shake tank reactor under heterotrophic conditions. The first assays were run with the quinone like terminal electron acceptor and two kinds of organic matter (acetate and *p*-cresol like recalcitrant compound). Both organic compounds were completely mineralized to  $\text{HCO}_3^-$  ( $Y_{\text{HCO}_3^-} = 1$ ) coupled to the reduction of AQDS to  $\text{AH}_2\text{QDS}$ , this finding agrees with the stoichiometry of the reaction. As much the acetate as the *p*-cresol had consumption efficiencies near to 100%, but the rates of oxidation were smaller than with nitrate like potential oxidizer. The denitrifying sludge was able to use to the AQDS like terminal electron acceptor for the oxidation of organic matter.

The AQDS was added to the denitrifying process in nitrate presence with organic matter. The quinone increased 43% the oxidation rate of acetate (500 mg/L) and 17% the nitrate reduction. With *p*-cresol decreased the lag phase of oxidation when it was present the quinone with regard to the control without quinona. It also passed the same with the nitrate reduction. There are signals that the quinone induces the formation of oxidation intermediates of the *p*-cresol, although at the end of the essay the *p*-cresol was recovered in form of  $\text{HCO}_3^-$  ( $Y_{\text{HCO}_3^-} = 1$ ). Likewise induces the nitrite formation that was recovered as  $\text{N}_2$  at the end of the essay ( $Y_{\text{N}_2} = 1$ ). The consumption efficiencies of the acetate and *p*-cresol when the AQDS was supplemented were nearly of 100%. Here, for the first time it is presented evidence of the participation of the AQDS like redox mediator in the oxidation of organic matter under denitrifying conditions.

Other quinones were tested in the *p*-cresol oxidation with nitrate: the alizarin and the menadione. In alizarin presence the oxidation of the *p*-cresol was faster than with the AQDS, with a high yield production of  $\text{HCO}_3^-$  ( $Y_{\text{HCO}_3^-} = 1$ ), while the denitrification was affected ( $Y_{\text{N}_2} = 0.45$ ). The menadione inhibits the complete oxidation from the *p*-cresol to  $\text{CO}_2$  ( $Y_{\text{HCO}_3^-} = 0.5$ ) but it doesn't inhibit the reduction of  $\text{NO}_3^-$  to  $\text{N}_2$  ( $Y_{\text{N}_2} = 1$ ). Different quinones, characterized by an oxidize-reduction potential, caused a significantly different metabolic effect on the oxidation of the *p*-cresol like the reduction of  $\text{NO}_3^-$  to  $\text{N}_2$ .

---

# **Capítulo 1**

## **INTRODUCCIÓN**

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Panorama Actual**

Actualmente uno de los problemas ambientales que más impacto ha tenido en la humanidad es la contaminación del agua, esto se ha derivado del desmedido crecimiento poblacional, una práctica agrícola intensiva y una indiscriminada actividad industrial. Sin embargo, más que el consumo de agua, el principal problema a nivel ambiental, es que la mayoría de esta agua no es tratada, lo cual tiene una repercusión directa en los ecosistemas. Claro ejemplo de este problema es el agua proveniente del uso industrial, la cual contiene elevadas cantidades de nitrógeno y carbono, entre otros contaminantes, y sólo un pequeño porcentaje de esas aguas son tratadas (CNA, 2004b).

Actualmente existen muchos tipos de tratamientos fisicoquímicos; sin embargo, la mayoría sólo transportan el problema de un lado a otro, y sus costos son elevados, por lo que es justificable la búsqueda de tratamientos más amigables, económica y ambientalmente. Los procesos biológicos han sido una alternativa de tratamiento que han probado ser más amigables, con el ambiente, así como económicamente.

De los contaminantes presentes en las aguas residuales, los compuestos carbonados y nitrogenados suelen estar en mayor proporción y una alternativa para su eliminación es la desnitrificación biológica. La desnitrificación es un proceso respiratorio que puede acoplar perfectamente, la eliminación de nitrógeno en forma de nitrato a nitrógeno, atmosférico con la transformación de materia orgánica de diferentes tipos a CO<sub>2</sub>. Sin embargo, un paso limitante es la velocidad del proceso ya que la materia orgánica que tiene una tasa de metabolización muy baja disminuye la rapidez de la desnitrificación (posiblemente más en el transporte de electrones). Esta limitante se acentúa cuando compuestos de difícil oxidación como el benceno, tolueno y compuestos fenólicos, actúan como fuente de energía en el proceso desnitrificante.

## **1.2 Tratamiento de Aguas Residuales**

El consumo de agua ha aumentado a través de los años, mas no así su regeneración a través del tratamiento del agua residual proveniente de la industria, el consumo urbano y la agricultura. Se estima que el consumo nacional de agua está dividido en: 83% para la agricultura, 11% para el consumo urbano, 5% de demanda industrial y 1% para otros usos. Del consumo urbano sólo se trata un 27.6% en 1077 plantas de tratamiento en operación y de los efluentes industriales, 15.3% en 1448 plantas de tratamiento (CNA, 2004a). Este bajo porcentaje de tratamiento se debe, entre otras cosas, a los elevados costos que representa el tratamiento de agua residual, además de que algunos de los procesos en uso, suelen ser no muy eficientes.

El tipo de contaminantes presentes en el agua es muy diverso y esto depende en gran medida del sector de donde provenga. Por ejemplo, el agua que proviene de la actividad agrícola contiene altos niveles de compuestos nitrogenados y fosforados. Las normas oficiales consideran contaminantes básicos a aquellos compuestos que se presentan en las descargas de aguas residuales y que pueden ser eliminados o estabilizados mediante tratamientos convencionales. En lo que corresponde a la norma NOM 001-ECOL-1996 sólo se consideran los siguientes contaminantes: grasas y aceites, materia flotante, sólidos sedimentables, sólidos suspendidos totales, materia orgánica en términos de demanda bioquímica de oxígeno, nitrógeno total (suma de las concentraciones de nitrógeno en forma de nitrito, nitrato, amonio y nitrógeno orgánico expresadas como mg/litro de nitrógeno) y fósforo total.

Existen en México 6 normas oficiales que estipulan los límites permisibles de contaminantes en el agua, las cuales abarcan a la industria, la agricultura y la población urbana (SEMARNAT, 2002b). De los contaminantes que se consideran mayores, debido a que su presencia es frecuentemente mucho más grande que otros, es el carbono y el nitrógeno (SEMARNAT, 2002a). El nitrógeno es considerado como uno de los principales factores de eutroficación de los cuerpos de agua receptores y de los mantos freáticos, que son una de las principales

fuentes de agua potable (Oakes, 1996). En cuanto al carbono, este puede estar presente de diversas formas, de las cuales algunas son biodegradables y otras recalcitrantes. Las últimas, derivadas de actividades petroleras y de la industria de la transformación, son las que representan un riesgo potencial a la salud pública y a los ecosistemas acuáticos, por su persistencia y acumulación en el ambiente.

El tratamiento de aguas resalta su importancia al ser la vía por la cuál se eliminan los elementos tóxicos que se presentan en vertientes originados de diferentes rubros, disminuyendo así el impacto de contaminantes en los ecosistemas, así como en la salud del ser humano.

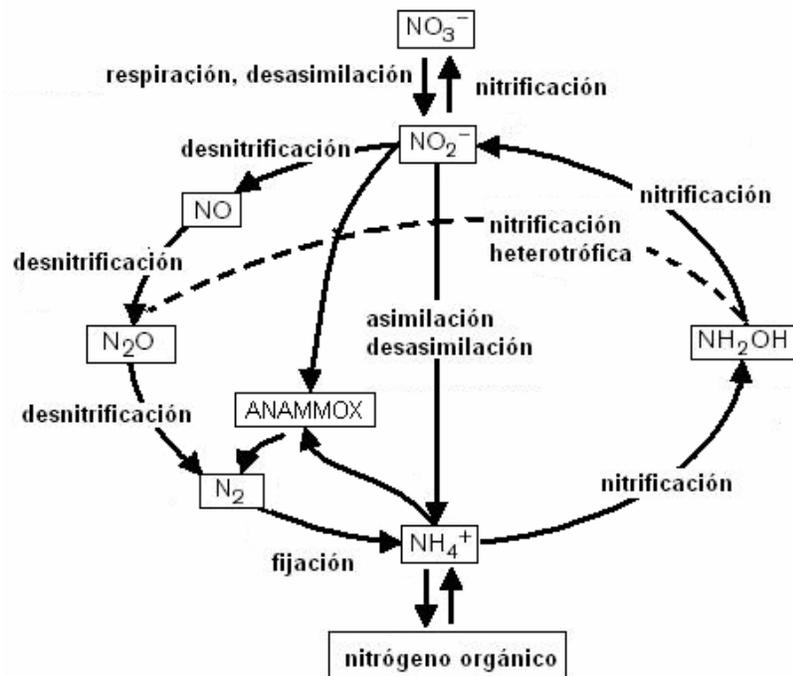
### **1.3 Eliminación de Nitrógeno**

El abatimiento de la contaminación por nitrógeno debe estar basado en un conocimiento de la cantidad y la forma presente del nitrógeno. Existen varios métodos para lograr este objetivo, los cuales se dividen principalmente en dos tipos: los fisicoquímicos y los biológicos. Entre los métodos fisicoquímicos se encuentran los siguientes: arrastre con aire a pH básico, coagulación por cloración, intercambio iónico, separación por membranas y precipitación (Sorensen y Jorgensen, 1993; Letterman, 1999). Para la eliminación biológica de nitrógeno de las aguas residuales se encuentran la nitrificación y la desnitrificación (Cheremisinoff, 1996).

Cada método presenta diferentes eficiencias de eliminación de nitrógeno dependiendo de la forma de éste (mayoritariamente amonio, nitrato y nitrógeno orgánico), de su concentración y de la configuración del sistema. La confiabilidad de un proceso de tratamiento en cuestiones operativas, suele ser mayor para los métodos fisicoquímicos que para los biológicos. Sin embargo, el tratamiento biológico suele ser menos caro que el fisicoquímico, además de ser más amigable con el ambiente (Sorensen y Jorgensen, 1993).

### 1.3.1 El Ciclo del Nitrógeno

Los microorganismos desempeñan un papel fundamental en la transformación del nitrógeno en los ecosistemas, lo que se puede observar por medio del ciclo biogeoquímico del nitrógeno realizado por procariontas (Figura 1). La fijación del nitrógeno molecular en los sistemas biológicos, se lleva a cabo por medio de la acción de la enzima nitrogenasa (Brock y Madigan, 1991; Ferguson, 1998). La desnitrificación es el medio por el cual regresa de nuevo a la atmósfera en forma de  $N_2$ , mediante la reducción de nitrato, aunque también se puede presentar  $N_2O$  que no es nada deseable ya que se le asocia al efecto invernadero. La nitrificación es complementaria de la desnitrificación, ya que en ella se oxida el amoníaco a nitrato.



**Figura 1.** Ciclo del Nitrógeno según Richardson y Watmough (1999).

El nitrato puede ser reducido a amonio, para su asimilación y la síntesis de biomasa. Otra ruta posible es la reducción desasimilativa de nitrato a amonio (RDNA) (Cole y Brown, 1980; Cole, 1988). También se ha reportado que la hidroxilamina puede ser reducida a óxido nítrico, por nitrificantes heterotróficos bajo condiciones anóxicas y microóxicas (Richardson y col., 1998). La formación

de  $N_2$  puede llevarse a cabo también a partir de nitrito y amonio, bajo condiciones anaerobias, proceso en general de tipo litoautotrófico al cual se le conoce como ANAMMOX (Van de Graff y col., 1995, 1996, 1997).

La forma más amigable hacia el entorno, en la eliminación de nitrógeno, es la desnitrificación, ya que el producto final es el  $N_2$ , gas inerte que está presente de manera natural en el ambiente. Otros procesos solo transportan el problema hacia otro medio.

### **1.3.2 Eliminación Biológica de Nitrógeno por Desnitrificación**

Las bacterias desnitrificantes pueden usar el nitrato como un aceptor alternativo de electrones generalmente en ausencia de oxígeno o en muy baja presión del mismo (Mateju y col, 1992). La reducción de nitrato a nitrógeno gaseoso ( $N_2O$ ,  $N_2$ ) que resulta en la pérdida de nitrógeno, en ambientes terrestres y acuáticos, es llamada desnitrificación.

La desnitrificación es un proceso de una considerable importancia ecológica con efectos tanto benéficos como perjudiciales dependiendo de las condiciones en que se lleve a cabo, ya que se puede acumular nitrito y  $N_2O$ . La desnitrificación es importante para reciclar al nitrógeno a la atmósfera. En combinación con la nitrificación y bajo condiciones adecuadas, se puede eliminar totalmente al amonio del agua en forma de nitrógeno molecular (Knowles, 1982).

El nitrógeno amoniacal en muchas formas puede agotar el oxígeno en ambientes acuáticos debido a la nitrificación y fertilización acuática (eutroficación), que conlleva al crecimiento vegetal teniendo grandes repercusiones en la fauna (Oakes, 1996). En forma de nitrato, contamina el manto freático que es una fuente principal de agua potable, presentando un riesgo en la salud pública. El nitrato puede reducirse a nitrito, el cual una vez ingerido reacciona con la hemoglobina en la sangre formando metahemoglobina, la cuál afecta a niños menores de tres meses debido a la falta de una enzima capaz de oxidar el nitrito (Douglass y col., 1978; Challis y Challis, 1982; Shuker, 1988). El nitrato ingerido, también puede ser usado como aceptor de electrones por las bacterias del sistema digestivo,

formando nitrito el cuál puede reaccionar con varias aminas para formar nitrosaminas que son cancerígenas. Estos datos recalcan de nuevo la importancia de la desnitrificación en el tratamiento de aguas (Gaudy y Gaudy, 1981; Hartman, 1983).

### 1.3.2.1 Microbiología de la Desnitrificación

Microbiológicamente sólo se consideran como bacterias desnitrificantes a aquéllas que reducen el nitrato a nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) u óxido nitroso ( $N_2O$ ). Este último interviene en el calentamiento global de la atmósfera, por lo cual es indeseable su formación y acumulación (Hong y col; 1994). Las bacterias que sólo reducen el nitrato a nitrito no pueden considerarse desnitrificantes (Gaudy y Gaudy, 1981). Los géneros más citados, en los cuales se ha observado una actividad desnitrificante incluyen: *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Thiobacillus* y *Thiosphaera*, entre otros (Tabla 1). Muchos son órgano heterótrofos y otros pueden crecer autotróficamente en hidrógeno y  $CO_2$ , o en compuestos sulfurados reducidos (Tiedje, 1988). Por esto se considera a la desnitrificación de dos tipos: la desnitrificación organotrófica (generalmente llamada heterotrófica) y la litoautotrófica (Cervantes y col., 2000a).

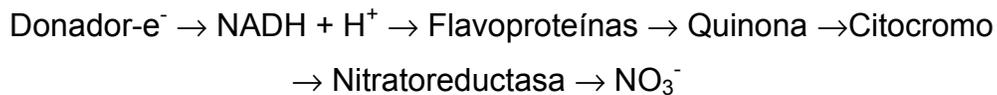
**Tabla 1.** Géneros bacterianos con capacidad desnitrificante (Cuervo, 2003).

Género	Características	Género	Características
<i>Pseudomonas</i>	Heterótrofas	<i>Rhodopseudomonas</i>	Fotótrofas
<i>Alcaligenes</i>	aerobias		
<i>Flavobacterium</i>			
<i>Paracoccus</i>			
<i>Azospirillum</i>	Heterótrofas	<i>Paracoccus</i>	Litoautótrofas
<i>Bacillus</i>	Fermentativas	<i>Alcaligenes</i>	de $H_2$
<i>Wolinella</i>		<i>Pseudomonas</i>	
<i>Rhizobium</i>	Heterótrofas	<i>Thiobacillus</i>	Litoautótrofas que
<i>Pseudomonas</i>	Fijadoras de $N_2$	<i>Thiosphaera</i>	utilizan $S_2^-$
<i>Rhodopseudomonas</i>		<i>Thiomicrospira</i>	
<i>Agrobacterium</i>			
<i>Neisseria</i>	Heterótrofas	<i>Nitrosomonas</i>	Litoautótrofas que
<i>Kingella</i>	Patógenas		utilizan $NH_4^+$
<i>Wollinella</i>			

### 1.3.2.2 Bioquímica de la Desnitrificación

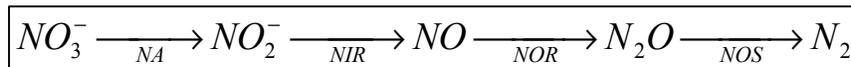
La desnitrificación es un proceso respiratorio donde el último aceptor de electrones es el nitrato en lugar del oxígeno, por lo que se le considera un proceso de tipo anóxico. Las bacterias pueden oxidar fuentes orgánicas o inorgánicas para extraerles los electrones, de cuyo transporte se generará la energía en forma de ATP necesaria para sostener el crecimiento y/o el mantenimiento microbiano (Ferguson, 1998).

Metabólicamente el primer paso en el proceso desnitrificante es la reducción de un transportador de electrones que puede donar sus electrones. Una posible ruta de este primer paso se muestra en la Figura 2.



**Figura 2.** Posible ruta de inicio de la desnitrificación.

La reducción de nitrato se lleva a cabo en cuatro pasos como se puede observar en la Figura 3.



**Figura 3.** Reducción del nitrato en un proceso desnitrificante

El primer paso es la reducción a nitrito por la nitrato reductasa (NA), que usa como cofactor al molibdeno (Stouthamer, 1976; Kroneck y *col.*, 1992; Ferguson, 1998). La segunda reducción donde el nitrito pasa a óxido nítrico se lleva a cabo por la nitrito reductasa (NIR). De esta enzima se han encontrado dos tipos, una que usa cobre en su sitio activo y otra un hemodímero cd1 con el mismo fin (Godden y *col.*, 1991; Jetten y *col.*, 1997). La reducción a óxido nitroso la realiza la óxido nítrico reductasa (NOR) (Carr y Ferguson 1990; Goretsky y Hollocher, 1990; Kroneck y *col.*, 1992). Por último la reducción a nitrógeno atmosférico se lleva a cabo por la óxido nitroso reductasa (NOS), que utiliza como

cofactor al cobre (Coyle y *col.*, 1985; Richardson y Watmough, 1999). Se ha encontrado que esta última enzima se sintetiza bajo condiciones desnitrificantes y su síntesis se ve afectada por la presencia de oxígeno (Ferguson, 1994; Zumft, 1997).

A menudo se puede presentar acumulación de intermediarios no deseables en la desnitrificación y esto depende de las condiciones en las cuales se lleve a cabo el proceso.

### **1.3.2.3 Factores que afectan la Desnitrificación**

Se considera que los tres factores primordiales que inducen y controlan al sistema desnitrificante son, la baja presión de oxígeno, la presencia de nitrato, y controles globales que permiten la expresión controlada de la ruta desnitrificante. También ejercen un efecto significativo el tipo de fuente de electrones, la relación carbono nitrógeno (C/N), la temperatura, el pH, y algunos nutrientes necesarios como cofactores (específicamente la concentración de Mo y Cu) (Cervantes y *col.*, 1998; Cuervo, 2003).

Las bacterias desnitrificantes heterótrofas requieren de una fuente de energía orgánica. Además necesitan molibdeno y cobre, ya que la falta de ellos provoca la acumulación de intermediarios (Cervantes y *col.*, 1998). Las bacterias desnitrificantes pueden utilizar un amplio espectro de fuentes de energía (donadores de electrones), como son: etanol, acetato, aspartato, metanol o ácido fórmico entre otros (Mateju y *col.*, 1992). También destacan los ácidos grasos volátiles, con los cuales se ha reportado altas eficiencias de eliminación de nitrato por desnitrificación (100%). El tipo de fuente de electrones es parte importante, debido que no todas las fuentes se metabolizan de la misma manera ni con una velocidad similar y que el aporte energético es siempre diferente (Mateju y *col.*, 1992). Hay evidencia de que la materia orgánica recalcitrante (por ejemplo tolueno y cresoles) puede ser utilizada como fuente de electrones en la desnitrificación, pero suele ser un proceso lento (Cervantes y *col.*, 2001).

La relación C/N es un factor que dirige el metabolismo a la asimilación o la desasimilación y/o rutas alternas entre ellas, como el caso de la RDNA. Cuando la relación C/N es muy grande, el nitrato alcanza un grado de reducción mayor que simplemente a  $N_2$ , produciéndose amonio. Teniendo un buen manejo de la relación C/N, la desnitrificación será completamente desasimilativa al no haber formación de biomasa. En general, la desnitrificación desasimilativa se lleva a cabo con relaciones C/N bajas, un poco superior al valor estequiométrico. Se ha visto que cuando la relación C/N está muy cerca de los valores estequiométricos, se presenta una acumulación de nitrito (Oh y Silversten, 1999).

Algunas evidencias muestran que la desnitrificación puede llevarse a cabo en un amplio intervalo de temperaturas desde 5 a 35°C. La temperatura tiene efecto sobre el crecimiento bacteriano, así como la velocidad y eficiencia de consumo de nitrato. La desnitrificación procede a una velocidad muy baja a 5°C. Por arriba de 20 °C se ha observado que la velocidad es constante y mayor (Sorensen y Jorgensen, 1993). Se recomienda trabajar entre 20 y 35 °C para obtener una velocidad adecuada (Cuervo, 2003).

Se ha visto que en la mayoría de los sistemas, la velocidad desnitrificante se ve inhibida a valores de pH menores que 6 y por arriba de 9. Varios autores han encontrado altas velocidades y altos rendimientos de desnitrificación a valores de pH de 7.0 a 7.5, aunque se ha encontrado que, bajo ciertas condiciones la desnitrificación funciona bien a valores de pH entre 6 y 9 (Halling-Sorensen y Hjuler, 1992; Sorensen y Jorgensen, 1993; Pérez, 1998).

### **1.3.3 Desnitrificación y Oxidación de Materia Orgánica**

La desnitrificación organotrófica (heterotrófica), como se mencionó anteriormente, es aquella que obtiene su energía a partir de la oxidación de compuestos orgánicos. Esta oxidación, en el mejor de los casos y dependiendo de las condiciones, se puede llevar a cabo hasta la formación de  $CO_2$ . Existen diversos reportes acerca de los diferentes tipos de materia orgánica que se pueden oxidar mediante bacterias desnitrificantes, en presencia de nitrato (Tabla 2). Sin embargo, en la mayoría de los casos no se especifica si el nitrato se redujo

completamente a nitrógeno molecular, por lo cual, muchos de estos reportes no presentan balances de materia y parece aventurado mencionar que la oxidación de esos compuestos se llevó a cabo bajo condiciones netamente desnitrificantes.

**Tabla 2.** Compuestos que se mencionan ser oxidados bajo condiciones desnitrificantes.

Compuestos carbonados		Referencias	
Alifáticos halogenados	Tetracloruro de carbono trihalometanos bromados 1,2-diclorometano cloruro de vinilo	Bouwer y McCarty Semprini y <i>col.</i>	1983 1992
Compuestos aromáticos fluorados	2-fluorobenzoato 4-fluorobenzoato	Vargas y <i>col.</i>	2000
Hidrocarburos poliaromáticos	Naftol, naftaleno, acenafteno, bifenilo, dibenzofurano y fenantreno.	Mohelcic y Lutthy Rockne y Strand	1988 1998
BTX's	Tolueno, etilbenceno, xilenos, 1,2,4-trimetilbenceno	Evans Hutchins Fukui y <i>col.</i>	1991 1991 2000
<i>n</i> -alcanos C <sub>12</sub> -C <sub>15</sub>	Hexano, alkilbencenos, n-hexadecano	Rabus y Widdel Rabus y <i>col.</i> Fukui y <i>col.</i> Chayabutra y Ju	1996 1999 2000 2000
Fenoles	Fenol, <i>m</i> -cresol, <i>p</i> -cresol.	Bossert y Young Tschech y Fuchs Ramanand y Suflita	1986 1987 1991
Cetonas	Acetona, metil-etil cetona, metil isobutil cetona, ácido fenil acetico.	Mormille Cozzarelli y <i>col.</i>	1994 1995
	Cumeno	Acton y Barker	1992
Alcoholes	Metanol, etanol, butanol, propanol, pentanol, glycol	Monteith y <i>col.</i> Wilson Lewandowski	1980 1985 1985
Otros	Succinato y glutamato	Sacks y Barrer	1952
	Nitrobenceno	Lyngkilde y Chistensen	1992
	Piridina	Ronen y Bollag	1992
	Estireno	Fu y Alexander	1996

## **1.4 Las Substancias Húmicas**

### **1.4.1 El humus**

El humus constituye una clase abundante de materia orgánica que es químicamente heterogénea y ampliamente distribuida en los ambientes terrestres y acuáticos (Field y *col.*, 2000). Las sustancias húmicas (SH) provienen de la repolimerización y biotransformación de fenol y compuestos aromáticos, que resultan de la descomposición de plantas y residuos animales, y no pueden ser clasificadas en categorías discretas como polisacáridos, proteínas, y poli nucleótidos. Las sustancias húmicas son macromoléculas complejas que consisten en una serie homogénea de estructuras aromáticas y alifáticas enlazadas de forma cruzada por medio de oxígeno o nitrógeno. Son bastante estables y la mayoría no son biodegradables (MacCarthy y *col.*, 1990). Se ha encontrado que este tipo de sustancias tienen una importante interacción con la biota, sobre todo en las reacciones bioquímicas, interaccionando con otros compuestos que pueden regular el crecimiento de microorganismos y plantas (Frimmel y Christman, 1988).

Las SH pueden ser aisladas sin problemas de casi todos los suelos, aguas y sedimentos. Los SH comprenden tres componentes básicos: huminas, ácidos húmicos y ácidos fúlvicos. Estos componentes están clasificados de acuerdo a su solubilidad. Las huminas son insolubles a todos los valores de pH, los ácidos húmicos son insolubles por debajo de un valor de pH de 2 y los ácidos fúlvicos son solubles a todos los valores de pH (MacCarthy y *col.*, 1990).

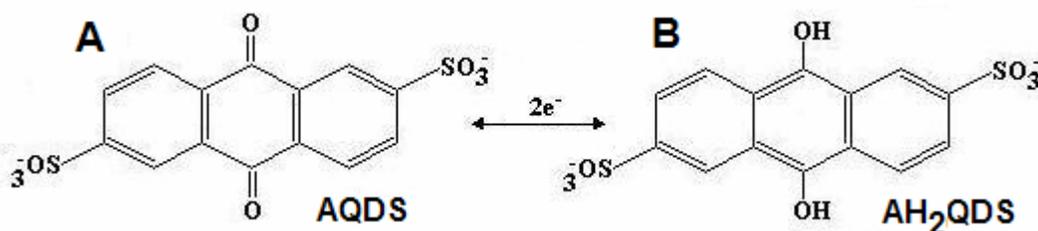
Los grupos funcionales que contienen las SH son los que determinan sus características físicas y químicas. Estos grupos varían y dependen del origen y de la edad del material. La mayoría de esos grupos funcionales son ácidos carboxílicos, fenoles e hidroxilos de alcoholes y grupos de quinonas. Su estructura le permite a las SH unirse a materiales hidrofóbicos e hidrofílicos.

Las SH juegan un papel importante en el destino y transporte de metales pesados e hidrocarburos contaminantes del ambiente (Frimmel y Christman, 1988).

Los grupos funcionales que contienen les permiten tener actividad redox. Se ha demostrado que pueden transferir electrones de compuestos orgánicos o inorgánicos reducidos a varios metales pesados, aromáticos nitrogenados y solventes clorados (Bradley y col., 1998; Lovley y Blunt-Harris, 1999b).

#### 1.4.2 Papel de las Substancias Húmicas en los Procesos Biogeoquímicos

Se ha encontrado que las SH pueden participar en los procesos microbianos y ha sido bien probado el papel óxido-reductor que puede tener el humus en el transporte de electrones a nivel microbiológico (Lovley y col., 1996a, 1999a). Existe evidencia de que las quinonas son los grupos que tienen la actividad redox en las SH (Scott y col., 1998; Newman y Kolter, 2000). Por esta razón a la 2,6-disulfonato de antraquinona (AQDS) se ha usado como un modelo alternativo (Figura 4).



**Figura 4.** La 2,6 Disulfonato de antraquinona, A) forma oxidada, AQDS, B) forma reducida AH<sub>2</sub>QDS

En todos los casos donde se utilizó a la AQDS como compuesto modelo de las SH, se han obtenido resultados similares a los encontrados con el uso de SH (Lovley y col., 1999a). Algunos reportes muestran que las bacterias que son capaces de utilizar las SH y AQDS en sus procesos metabólicos, están ampliamente distribuidas en los ecosistemas (Coates y col. 1998; 2002). La reducción de las SH y AQDS puede ser acoplada por las bacterias a la oxidación de materia orgánica recalcitrante como aceptor final de electrones (Field y col., 2000; Cervantes y col., 2001). Todos estos procesos sólo se pueden llevar a cabo en condiciones anaerobias.

Compuestos como el benceno, tolueno, y compuestos fenólicos han sido oxidados a  $\text{CO}_2$  mediante procesos respiratorios con la ayuda de las SH en sus formas oxidadas, así como AQDS, funcionando como aceptores finales de electrones (Lovley 1996b; Cervantes y col., 2000b, 2001). Hay evidencias de que la respiración con quinona, suele ser más favorable que la metanogénesis para materia orgánica de importancia ecológica (Cervantes y col., 2000c). En efecto, los procesos de oxidación de materia orgánica con quinonas son amigables al ambiente, ya que todos se dirigen a la formación de  $\text{CO}_2$ , mientras que la metanogénesis produce  $\text{CH}_4$ . La AQDS puede mediar la reducción de metales de forma abiótica, acoplándose a procesos respiratorios tal como la oxidación anaerobia del benceno (Lovley y col, 1998; Lovley y Blunt-Harris, 1999b).

Hay trabajos donde se muestra que las SH y la AQDS pueden funcionar como aceptor final de electrones en la oxidación de materia orgánica, también hay trabajos donde se muestra claramente que la forma reducida de las SH y la  $\text{AH}_2\text{QDS}$  pueden servir como donadores de electrones al proceso desnitrificante reduciendo el nitrato a nitrógeno molecular y también en algunos casos a amonio (Lovley y col., 1999a; Coates y col., 2002). No existen estudios en los cuales las SH y AQDS pudieran funcionar como transportadores de electrones o coadyuvantes en el transporte de los mismos entre la desnitrificación y la oxidación de materia orgánica.

Esto lleva a varias preguntas:

¿Es posible acoplar el proceso oxidativo de materia orgánica al proceso desnitrificante mediado por quinonas?

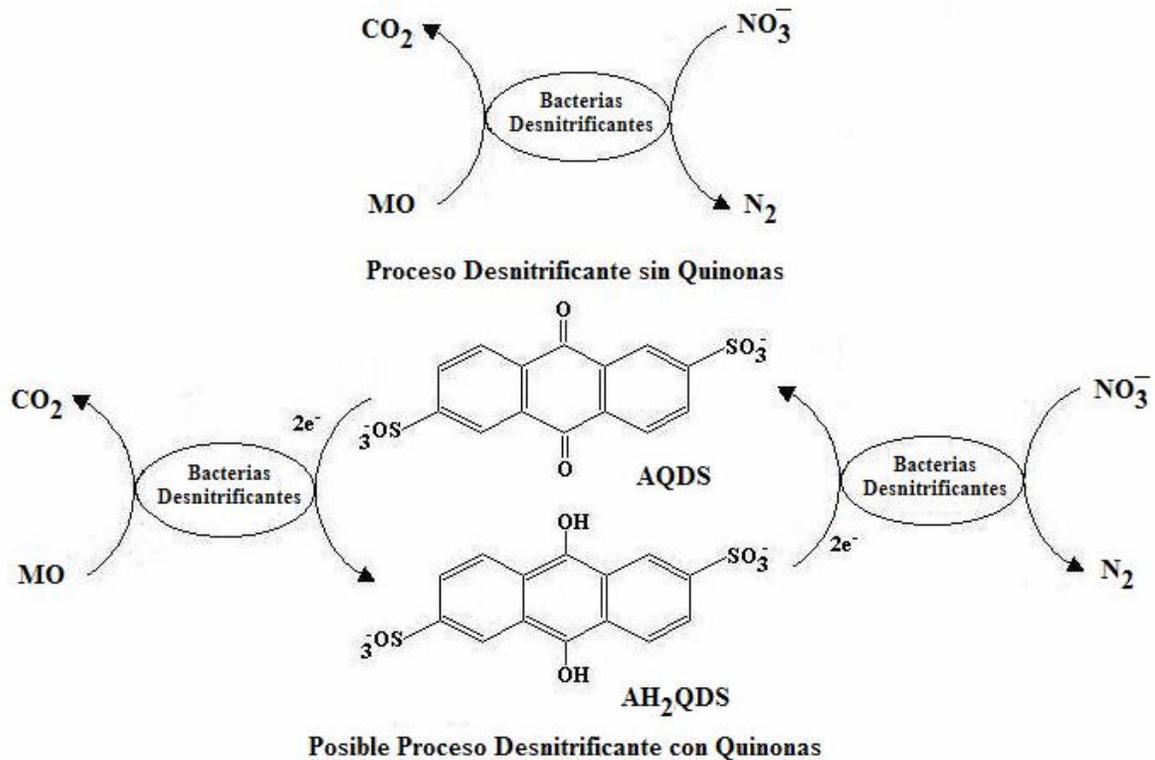
¿Es posible que las quinonas sean mediadores en el transporte de electrones entre estos dos procesos?

¿Pueden ciclarse la forma oxidada y reducida del disulfonato -de antraquinona durante este proceso?

¿Cuáles serán los productos finales de la reducción del nitrato y de la oxidación de materia orgánica?

La oxidación de materia orgánica recalcitrante bajo condiciones desnitrificantes se caracteriza por velocidades bajas. Esto dirige a la pregunta ¿Es posible que esta mediación por quinonas en el transporte de electrones mejore la velocidad del proceso desnitrificante y/o la oxidación de la materia orgánica?

La Figura 5 muestra un ejemplo de lo que se persigue con estas preguntas.



**Figura 5.** Acoplamiento de un proceso respiratorio de oxidación anaerobia de materia orgánica (MO) con la desnitrificación mediado por quinonas.

---

## **Capítulo 2**

# **OBJETIVOS**

---

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

El objetivo general de este estudio es evaluar el efecto de las quinonas en la oxidación anaerobia de materia orgánica recalcitrante por un lodo desnitrificante.

### 2.2 Objetivos particulares

Se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- ❖ Evaluar el efecto de la AQDS en la velocidad de oxidación anaerobia de *p*-cresol por un lodo desnitrificante en estado estacionario.
- ❖ Evaluar el efecto de AQDS/AH<sub>2</sub>QDS en la velocidad desnitrificante.
- ❖ Evaluar la posibilidad de acoplar la oxidación anóxica del *p*-cresol con la desnitrificación mediante el reciclamiento de AQDS/AH<sub>2</sub>QDS.

---

# **Capítulo 3**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Estabilización del reactor continuo desnitrificante en estado estacionario

##### 3.1.1 Descripción del reactor

Con el fin de obtener un cultivo desnitrificante, fisiológica y metabólicamente estable para utilizarlo posteriormente como inóculo en las pruebas en lote, se utilizó un biorreactor anaerobio de tanque agitado de 2 L, con un volumen de operación de 1.6 L (Figura 6). El sistema se operó con dos bombas peristálticas, cada una conectada a un temporizador. Este sistema contó con un controlador de temperatura para trabajar a 28 °C, un motor de velocidad variable con el cual se trabajó a 230 rpm y un sistema de sedimentación a la salida del efluente, el cuál permitió la recirculación de lodo. El gas producido por el reactor se recolectó en una columna rellena con una solución salina (NaCl al 30%, rojo de metilo, pH = 3) para determinar la producción a partir del desplazamiento de la solución.

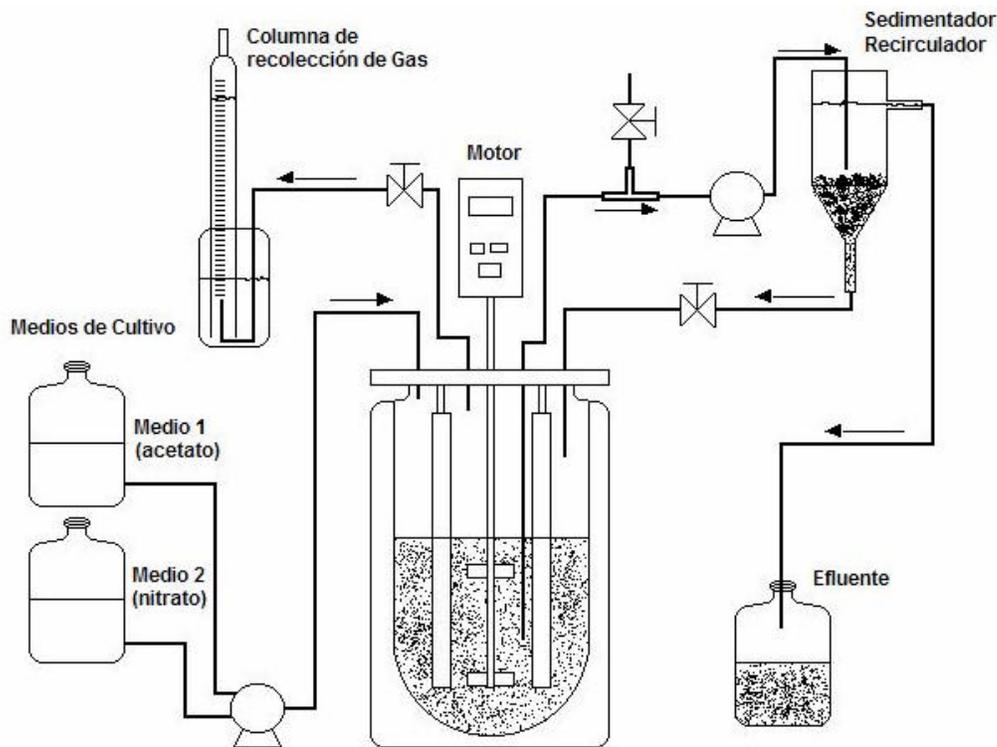


Figura 6. Esquema del reactor continuo desnitrificante de tanque agitado.

### 3.1.2 Inóculo

El inóculo que se utilizó en el biorreactor continuo se obtuvo de la planta de tratamiento de aguas residuales de la Universidad Autónoma Metropolitana, Campus Iztapalapa. El lodo fue lavado con solución fisiológica (NaCl, 0.9%) antes de inocular el reactor a una concentración final en el reactor de 5.1 g SSV/L.

### 3.1.3 Medio de cultivo

El reactor fue alimentado con dos medios de cultivo por separado: uno que contenía la fuente de carbono ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) y otro que contenía la fuente de nitrógeno ( $\text{NaNO}_3$ ), con el fin de evitar la precipitación de las sales y mantener su disponibilidad en el cultivo. Para dirigir el metabolismo del lodo de modo organotrófico y desnitrificante en condiciones desasimilativas, se utilizó como fuente de electrones al acetato y como aceptor final de electrones al nitrato. La relación C/N fue de 1.4. La velocidad de carga de nitrógeno fue de 300 mg de  $\text{N-NO}_3^-/\text{L}\cdot\text{d}$  y de carbono de 420 mg de  $\text{C-CH}_3\text{COO}^-/\text{L}\cdot\text{d}$ . El flujo de alimentación de cada uno de los medios fue de 0.45 L/d. El tiempo de residencia hidráulica (TRH) fue de 1.8 días. Los nutrientes y micro elementos adicionados se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3** . Composición del medio de cultivo

Medio 1: Fuente de Carbono			Medio 2: Fuente de Nitrógeno		
$\text{CH}_3\text{COONa}$	5.01	g/L	$\text{NaNO}_3$	5.66	g/L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2	g/L	$\text{FeCl}_3(6\text{H}_2\text{O})$	0.1	g/L
$\text{CaCl}(2\text{H}_2\text{O})$	0.6	g/L	$\text{CuSO}_4(5\text{H}_2\text{O})$	0.02	g/L
$\text{NaMoO}_4$	0.12	g/L			
$\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$	0.4	g/L			

### **3.1.4 Reactor en estado estacionario**

Se evaluaron las variables de respuesta del biorreactor durante 45 días. Se calcularon las velocidades de carga y de descarga de las fuentes de carbono ( $Q_C$ ) y de nitrógeno ( $Q_N$ ), midiendo en el influente y el efluente cada uno de los componentes ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ), así como la velocidad de producción de gas ( $\text{N}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}_2$ ) y de biomasa. Se determinaron los rendimientos de producción de biomasa ( $Y_{\text{BM}}$ ), de nitrógeno molecular ( $Y_{\text{N}_2}$ ) y de carbono inorgánico ( $Y_{\text{HCO}_3}$ ), además de las eficiencias de consumo de nitrato ( $E_{\text{NO}_3}$ ) y acetato ( $E_{\text{acetato}}$ ).

### **3.2 Pruebas en lote**

Se realizaron pruebas en lote para evaluar el efecto de las quinonas en la eliminación de materia orgánica recalcitrante, por un lodo desnitrificante, por medio de estudios cinéticos.

En todos los casos se utilizó el mismo medio basal definido más adelante y la misma concentración de inóculo. El trabajo se dividió en dos partes, la primera fue evaluar el efecto de la quinona como potencial oxidativo en la oxidación de MO, y la segunda fue evaluar el efecto de la quinona en el proceso desnitrificante con la MO.

En la primera parte del estudio se utilizaron dos fuentes de carbono: el acetato como punto de comparación y el *p*-cresol como MO recalcitrante. En los ensayos correspondientes se probó primero la oxidación de acetato y del *p*-cresol con  $\text{NO}_3^-$  y después con AQDS.

Una vez que se terminaron los ensayos para observar si el lodo desnitrificante podía oxidar la MO, tanto con nitrato, como con la quinona, en la segunda parte del trabajo, se corrieron cinéticas en lote para evaluar el comportamiento del proceso desnitrificante con MO en presencia de quinona. Se probaron ensayos con nitrato, acetato y AQDS y otros con nitrato, *p*-cresol y AQDS.

Como controles se corrieron ensayos con lodo estéril y otros con inóculo activo pero sin aceptor de electrones ( $\text{NO}_3^-$  o AQDS) o sin donador de electrones (acetato o *p*-cresol).

Todos los cultivos se llevaron a cabo en botellas serológicas de 60 ml con tapones de hule y sellos de aluminio para trabajar bajo condiciones anaerobias. El volumen de trabajo fue de 40 ml con un espacio de cabeza de 20 ml.

### 3.2.1 Medio de Cultivo

En todos los ensayos con nitrato, se manejó una relación C/N con un valor un poco superior a la estequiométrica, es decir de 1.2 para los ensayos con el acetato y de 0.98 con el *p*-cresol. La concentración inicial de carbono se fijo en 50 mg C/L. La quinona en su forma oxidada (AQDS) se manejó a una concentración inicial de 11 mM. Tanto las relaciones C/N como la concentración de AQDS se fijaron en base a las estequiometrías de las reacciones correspondientes (Tabla 4).

**Tabla 4.** Estequiometría y cambios de energía libre estandar ( $\Delta G^\circ$ ) para el acetato y el *p*-cresol, con dos fuentes oxidantes diferentes, el  $\text{NO}_3^-$  y la AQDS.

Reacción	$\Delta G^\circ$ (kJ reacción <sup>-1</sup> )*
$\text{CH}_3\text{COO}^- + 1.6 \text{NO}_3^- + 0.6 \text{H}^+ \rightarrow 0.8 \text{N}_2 + 2 \text{HCO}_3^- + 0.6 \text{H}_2\text{O}$	-479.8 .....(1)
$\text{CH}_3\text{COO}^- + 4 \text{AQDS} + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4 \text{AH}_2\text{QDS} + 2 \text{HCO}_3^- + 2 \text{H}^+$	-73 .....(2)
$\text{HOC}_6\text{H}_4\text{CH}_3 + 6.8 \text{NO}_3^- \rightarrow 3.4 \text{N}_2 + 6.8 \text{HCO}_3^- + 0.6 \text{H}_2\text{O} + 0.2 \text{O}_2$	-2095.4 .....(3)
$\text{HOC}_6\text{H}_4\text{CH}_3 + 17 \text{AQDS} + 20 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 17 \text{AH}_2\text{QDS} + 7 \text{HCO}_3^- + 7 \text{H}^+$	-365.7 .....(4)

\*Energías calculadas a partir de lo datos de Thauer y col. (1977) y Hollinger y col. (1988).

La composición en micro-nutrientes del medio utilizado en los cultivos en lote fue la siguiente (g/L):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2;  $\text{CaCl}_2(2\text{H}_2\text{O})$ , 0.6;  $\text{NaMoO}_4(2\text{H}_2\text{O})$ , 0.12;  $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$ , 0.4;  $\text{FeCl}_3(6 \text{H}_2\text{O})$ , 0.1;  $\text{CuSO}_4(5\text{H}_2\text{O})$ , 0.02. Las soluciones con micro-nutrientes y el nitrato se prepararon por separado y se mezclaron hasta el momento de montar las cinéticas. La AQDS se adicionó al último. El agua destilada con la cual se prepararon las soluciones se hirvió por 5 minutos con el fin de eliminar el oxígeno disuelto y se enfrió a una temperatura de 50°C antes de disolver los componentes. Las soluciones concentradas de acetato y *p*-cresol se prepararon en agua desionizada por separado. En el caso de los controles

estériles, el medio de cultivo fue filtrado un filtro estéril de 0.45  $\mu\text{m}$ . En todos los casos, el pH inicial se ajustó a 7.

### **3.2.2 Preparación del inóculo**

El lodo que se utilizó en las pruebas en lote provino del reactor continuo de tanque agitado previamente estabilizado. Se determinaron los sólidos suspendidos volátiles (SSV) en el reactor, con el fin de determinar el volumen del cultivo necesario para inocular los ensayos en lote.

El lodo fue lavado 3 veces con 2 L de solución fisiológica (NaCl, 0.9%), centrifugado y resuspendido nuevamente con solución isotónica. Se tomaron alícuotas de 10 ml y se centrifugaron (4200 rpm, 10 min). Se eliminó el sobrenadante y se adicionó el inóculo a las botellas con el medio previamente preparado. Cada cultivo se burbujeó con una corriente de helio (Praxair He 4.8) por 10 min con el fin de eliminar trazas de oxígeno; y por último se adicionaron alícuotas de las fuentes carbonadas correspondientes. Una vez selladas las botellas, se saturó el espacio de cabeza con helio y se incubaron a 30°C con una agitación de 150 rpm.

Para los controles estériles se siguió el mismo procedimiento anteriormente descrito para extraer el inóculo del reactor continuo. Una vez lavado el lodo, se tomaron alícuotas de 10 ml las cuales se esterilizaron a 120°C por 20 min, después se pusieron a incubar por 24 hr a 28°C, una vez pasado este periodo se volvieron a esterilizar, este procedimiento se repitió cuatro veces. Por último se centrifugaron a 4200 rpm por 10 min y se inocularon las botellas para tener una concentración final de 1 gr de SSV/L en las botellas serológicas.

A diferentes intervalos de tiempo se tomaron muestras de las fases líquida y gaseosa para analizar los siguientes compuestos:  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , acetato y *p*-cresol. La  $\text{AH}_2\text{QDS}$  se midió por Voltamperometría Cíclica (Electroquímica) a lo largo de las cinéticas directamente en la cada botella serológica. Cada ensayo se realizó por duplicado y en caso necesario por triplicado.

### **3.3 Métodos de análisis**

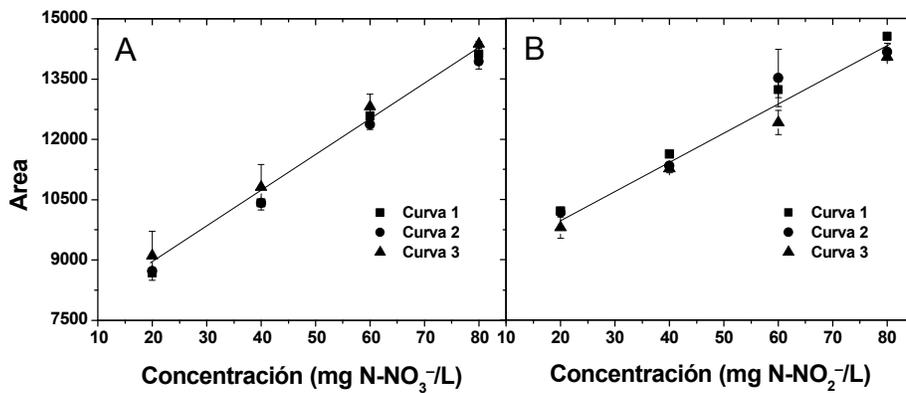
#### **3.3.1 Cuantificación de Nitrato y Nitrito**

El análisis de nitrato y nitrito se realizó con un analizador capilar de iones (CIA, Prince Technologies CE 221, versión de software 1.1), a una temperatura de 28°C. El capilar que se empleó fue una columna de sílice fundida de 80 cm de largo y 75  $\mu\text{m}$  de diámetro interno. Se utilizaron una corriente de 10  $\mu\text{A}$  y un voltaje negativo de 20 kV. El modo de inyección fue por presión a 30 mbars por 0.1 minutos. La detección se hizo a 214 nm con una lámpara ultravioleta (Bischoff, modelo Lambda 1010). El tiempo de corrida fue de 4.5 min con 5 min de purga entre cada muestra. Los datos fueron adquiridos con un software Empower 1154 versión 5 (Waters).

El electrolito de trabajo se compone de 10 ml de una solución 0.1 M de  $\text{NaSO}_4$  y 3 ml de la solución CIA-Pak OFM Anion-BT (Waters) aforado a 100 ml todo con agua desionizada (milliQ 8.1). La solución de electrolito fue filtrada con una membrana de un tamaño de poro 0.45  $\mu\text{m}$ .

*Preparación de las muestras para el análisis en el CIA:* 5 ml de muestra se someten a centrifugación a 12000 rpm por 10 min, y el sobrenadante se filtra con una membrana de nylon (0.45  $\mu\text{m}$ ). Se toman alícuotas y se hacen diluciones en agua desionizada (MilliQ 8.1) para tener un máximo de concentración de  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{NO}_2^-$  de 50 mg/L, todas las muestras se analizaron por duplicado.

Para establecer una curva de calibración, soluciones de  $\text{N-NO}_2^-$  y  $\text{N-NO}_3^-$  fueron preparadas a diferentes concentraciones con agua desionizada (milliQ 8.1) y filtradas a 0.45  $\mu\text{m}$ . Las curvas se realizaron por triplicado (Figura 7).



**Figura 7.** Curvas de calibración de nitrato (A) y nitrito (B), obtenidas por electroforesis capilar.

Las curvas se analizaron por regresión lineal y se calcularon, la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de correlación, a los cuales se les estimó el coeficiente de variación (CV). Los resultados de las tres curvas se presentan en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Estimadores de los componentes de las curvas de calibración para  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  para la pendiente (M), ordenada al origen (B) y coeficiente de correlación (R).

	Nitrito			Nitrato		
	M	B	R	M	B	R
<b>Curva 1</b>	0.014	119.0	0.99	0.011	81.4	0.99
<b>Curva 2</b>	0.013	107.1	0.99	0.012	72.4	0.99
<b>Curva 3</b>	0.014	119.5	0.99	0.011	78.5	0.99
<b>Media</b>	0.014	115.2	0.99	0.011	77.4	0.99
<b>Desv. Estd.</b>	0.001	7.0	0.00	0.001	4.6	0.0
<b>CV. (%)</b>	4.2	6.1	0.0	5.1	5.9	0.0

### 3.3.2 Acetato

La cuantificación se realizó por electroforesis capilar (CIA, Prince Technologies CE 221, versión de software 1.1) aplicando una corriente de  $15 \mu\text{A}$  y un voltaje negativo de 16 kV. El capilar que se empleó fue una columna de sílice fundida, de 80 cm de largo y  $75 \mu\text{m}$  de diámetro interno. El modo de inyección fue por presión a 30 mbars por 0.1 minutos. La detección se realizó a 254 nm. El tiempo de corrida fue de 6 min con 5 min de purga entre cada muestra.

El electrolito de trabajo se preparó adicionando 5 ml de una solución de ftalato ácido de potasio (20.42 g/L) y 2.5 ml de la solución CIA-Pak OFM Anion-BT (Waters). Se ajustó el pH a 5.6 y aforó a 100 ml con agua desionizada (milliQ 8.1). La solución de electrolito fue filtrada con una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ .

*Preparación de las muestras para el análisis de acetato en el Cl.* El proceso fue similar al protocolo anteriormente descrito para el análisis de  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ . La concentración máxima de las muestras a analizar fue de 20 mg Carbono/L. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

Se realizaron curvas de calibración con soluciones estándar de acetato a diferentes concentraciones. Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada (milliQ 8.1) y se filtraron (0.45  $\mu\text{m}$ ). Se presentan los valores de las tres curvas en la Tabla 6.

**Tabla 6** Estimadores de los componentes de las curvas de calibración para el acetato, para la pendiente (M), ordenada al origen (B), y coeficiente de correlación (R).

	<b>Acetato</b>		
	<b>M</b>	<b>B</b>	<b>R</b>
<b>Curva 1</b>	1034.7	99.7	0.99
<b>Curva 2</b>	1044.5	105.4	0.99
<b>Media</b>	1039.6	102.5	0.99
<b>Desv. Estd.</b>	6.9	4.0	0.00
<b>CV. (%)</b>	0.7	3.9	0.0

### 3.3.3 Análisis de los gases: $\text{N}_2$ , $\text{N}_2\text{O}$ , $\text{CH}_4$ , $\text{CO}_2$

El análisis de gases se hizo por cromatografía de gases con un cromatógrafo de gases Varian 3350, con un detector de conductividad térmica. La adquisición de datos se realizó con un software Empower 1154 versión 5 (Waters). Como gas de arrastre se usó helio (4.8 Praxair) a un flujo de 16 mL/min. Se utilizó una columna de acero de 1.2 m de largo y 1/8'' de diámetro, empacada con Poropak Q de malla 80-100. La columna se trabajó a una temperatura de 35°C; el inyector a 100°C; el detector a 110°C y el filamento a 135°C. El volumen de inyección fue de 100  $\mu\text{L}$ .

La cuantificación de nitrógeno molecular y óxido nitroso en el reactor se basó en la ley general de los gases, ya que 1 mol de gas a 1 atm y 273K ocupa 22.4L. El volumen estándar que ocupa 1 mol de gas bajo las condiciones experimentales se calculó con la siguiente relación, considerando que la presión atmosférica de la ciudad de México es de 0.8 atm.

$$V_{\text{nitrógeno}} = \frac{T_E * P_R * F_{GR} * f}{T_R * P_A} [=] \frac{L}{d} \dots\dots\dots (1)$$

$V_{\text{nitrógeno}}$  = Velocidad de producción de nitrógeno bajo condiciones estándar.  
 $F_{GR}$  = Flujo del gas medido por desplazamiento de solución salina en una columna (L/d)  
 $T_E$  = Temperatura estándar (298.15 K)  
 $P_R$  = Presión atmosférica a la que opera el reactor. (0.8 atm)  
 $f$  = fracción del nitrógeno contenido en el flujo de gas medido por cromatografía de gases.  
 $T_R$  = Temperatura de operación en el reactor (301.15 K)  
 $P_A$  = Presión estándar (1 atm).

Después se calcula la velocidad volumétrica de producción de nitrógeno atmosférico (mg N/L\*d).

$$Q_{N_2} = \frac{V_{\text{nitrógeno}} * P_A * PM_{N_2}}{R * T_E * V_R} [=] \frac{mg * L}{d} \dots\dots\dots (2)$$

Donde;  
 $R$  = Constante de los gases ideales (0.082 atm \* L/K \* mol)  
 $V_R$  = Volumen de operación del reactor.  
 $PM_{N_2}$  = Peso molecular del  $N_2$  (mg/mol)

Para la cuantificación en los ensayos en lote, se realizaron curvas de calibración de nitrógeno atmosférico a diferentes concentraciones. Se presentan las curvas en la Figura 8.

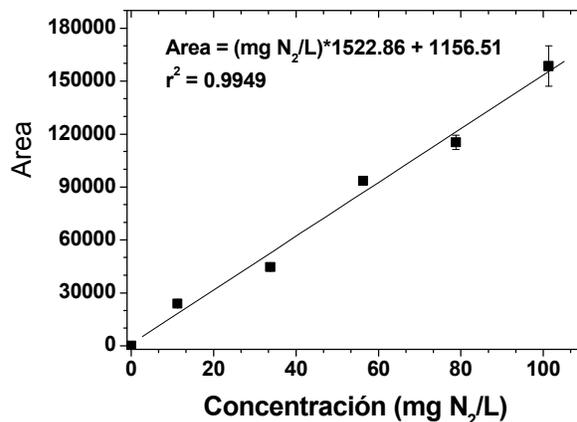


Figura 8. Curvas de calibración nitrógeno atmosférico obtenidas por cromatografía de gases.

### 3.3.4 Cuantificación de amonio

El método utilizado fue con un electrodo selectivo del ion amonio (pHoenix Electrode Co.) cuya linealidad se produce en un intervalo de 0.01 a 100 mg/L de amoniaco.

*Preparación de las muestras para el análisis de  $NH_4^+$  por el electrodo de ion selectivo:* en un matraz de 50 ml con un agitador magnético se pone un volumen de muestra de 50 mL previamente centrifugada (4500 rpm, 5 min) y se alcaliniza con 0.5 mL de 10N NaOH. El electrodo se coloca con una inclinación de  $45^\circ$  para evitar la formación de burbujas y se toma la lectura cuando el valor en mV del potenciómetro es estable (6 min aprox.).

Se realizaron curvas de calibración con soluciones estándar de amonio a diferentes concentraciones. Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada (milliQ 8.1) a partir de una solución estándar de  $(NH_4)_2SO_4$ . Se presentan los valores de las tres curvas en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Estimadores de los componentes de las curvas de calibración para el amonio, para la pendiente (M), ordenada al origen (B), y coeficiente de correlación (R).

	Amonio		
	M	B	R
<b>Curva 1</b>	-0.0141	0.0817	0.99
<b>Curva 2</b>	-0.0138	0.0831	0.99
<b>Curva 3</b>	-0.0135	0.0757	0.99
<b>Media</b>	-0.014	0.080	0.99
<b>Desv. Estd.</b>	0.003	0.003	0.00
<b>CV. (%)</b>	2.2	4.9	0.0

### 3.3.5 Carbono Orgánico e Inorgánico

El carbono orgánico, así como el inorgánico, se cuantificaron en un analizador de carbono orgánico total (Shimadzu, TOC-5000). Este equipo cuenta con un tubo de combustión para carbono que opera a una temperatura de  $680^\circ C$ . Se utilizó oxígeno de alta pureza como fase móvil. La muestra, fue de 10 ml. Los gases de la muestra son registrados por un detector infrarrojo sensible a  $CO_2$ ,

dando un área que es proporcional a la concentración en carbono que contiene la muestra.

*Preparación de las muestras para el análisis en el TOC:* 10 ml de muestra se someten a centrifugación a 12000 rpm por 10 min y el sobrenadante se filtra con una membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$ . Se hacen las diluciones necesarias en agua desionizada (MilliQ 8.1). Todas las muestras se analizaron por duplicado

Para determinaciones posteriores fue necesario hacer una curva de calibración la cual se realizó con diferentes concentraciones de carbono orgánico e inorgánico (Tabla 8). Hay que observar que el pH final en el reactor fue de 9.08 y superior de 7.3 en las cinéticas en lote, de modo que la mayoría del carbono inorgánico producido, se pudo medir en forma de  $\text{HCO}_3^-$ .

**Tabla 8** Estimadores de los componentes de las curvas de calibración para carbono orgánico total e inorgánico, para la pendiente (M), ordenada al origen (B), y coeficiente de correlación (R).

	Carbono Total			Carbono Inorgánico		
	M	B	R	M	B	R
<b>Curva 1</b>	74.0	157.6	0.99	34.0	153.6	0.99
<b>Curva 2</b>	73.9	158.9	0.99	33.9	156.1	0.99
<b>Curva 3</b>	74.2	156.5	0.99	34.1	149.9	0.99
<b>Media</b>	74.0	157.7	0.99	34.0	153.2	0.99
<b>Desv. Std.</b>	0.1	1.2	0.00	0.1	3.1	0.00
<b>CV. %</b>	0.1	0.7	0.1	0.3	2.0	0.0

### 3.3.6 Sólidos suspendidos volátiles

Para cuantificar la producción de biomasa, se midieron los sólidos suspendidos volátiles con el método descrito en APHA (1985). Dos crisoles se llevaron a peso constante a 550°C por 1 h en una mufla, luego se dejan enfriar en un desecador y se pesan (peso A). Se toman 10 ml de muestra del cultivo totalmente homogeneizado, se evapora totalmente el líquido en una parrilla a baja temperatura, antes de meter los crisoles a una estufa a 105°C por 1 h. Se pesan con la muestra seca hasta que el peso sea constante (peso B). Por último se

ponen los crisoles con la muestra en la mufla a 550°C por 45 min para cuantificar los sólidos suspendidos fijos. Se pasa a un desecador y se deja enfriar, se pesa y se verifica que el valor sea constante (peso C). Las determinaciones se hicieron por duplicado.

La concentración de sólidos suspendidos totales (SST), se calculó de la forma siguiente.

$$SST(g/L) = \frac{B - A}{V} \dots\dots\dots (3)$$

Donde A es el peso de crisol (g), B el peso de crisol + muestra seca (g) y V el volumen de la muestra (L).

Los sólidos suspendidos fijos (SSF) se obtienen también en g/L, como

$$SSF(g/L) = \frac{C - A}{V} \dots\dots\dots (4)$$

Donde A es el peso de crisol (g), C el peso de crisol + residuo (g) y V el volumen de la muestra (L).

Por diferencia se tienen los sólidos suspendidos volátiles.

$$SSV(g/L) = SST - SSF \dots\dots\dots (5)$$

### **3.3.7 p-Cresol**

La determinación del *p*-cresol se realizó por medio de cromatografía de gases, con un cromatógrafo Varian 3350 y se utilizó un detector de ionización de flama FID (H<sub>2</sub>, aire). Como gas acarreador, se utilizó helio a 16 mL/min. La columna de separación fue una columna capilar Cuadrex BTR-CW-30V.1.0F de una longitud de 30 m y un diámetro interno de 530 μm. La fase estacionaria fue de Carbowax/BTR. Las temperaturas del detector, columna e inyector fueron de 280, 187 y 200°C respectivamente. La adquisición de datos se llevó a cabo con un integrador Shimadzu modelo CR501 Chromatopac. El volumen de inyección fue de 10 μL.

*Preparación de las muestras para el análisis de p-cresol en el cromatógrafo de gases:* 5 ml de muestra se someten a centrifugación a 12000 rpm por 10 min y el sobrenadante se filtra con una membrana de nylon (0.45  $\mu\text{m}$ ) para su análisis posterior. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

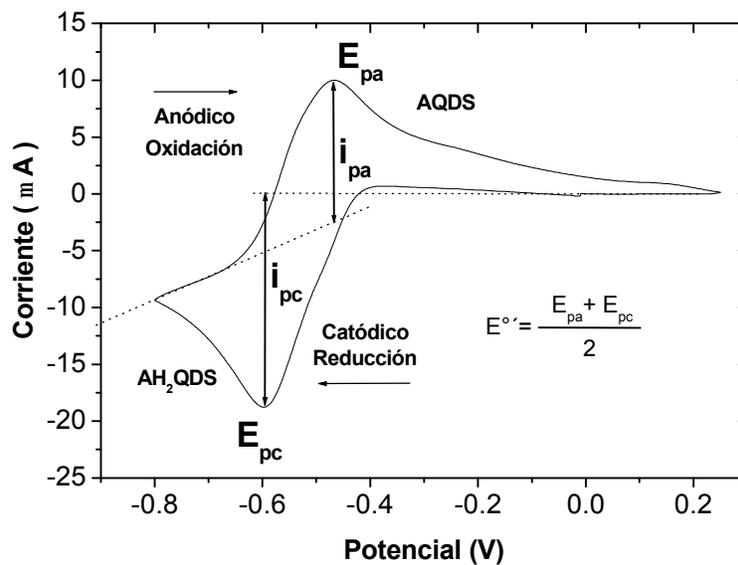
Para validar el método se realizaron curvas de calibración a diferentes concentraciones de p-cresol (Tabla 9).

**Tabla 9 .** Estimadores de los componentes de las curvas de calibración para el p-cresol, para la pendiente (M), ordenada al origen (B), y coeficiente de correlación (R).

	<b>p-cresol</b>		
	<b>M</b>	<b>B</b>	<b>R</b>
<b>Curva 1</b>	7045.1	-15180	0.99
<b>Curva 2</b>	6666.8	-15060	0.99
<b>Curva 3</b>	7081.6	-15700	0.99
<b>Media</b>	6931.2	-15316	0.99
<b>Desv. Std.</b>	229.7	338	0.00
<b>CV. %</b>	3.3	2.2	0.0

### 3.3.8 Determinación de la AQDS

La medición de la AQDS/AH<sub>2</sub>QDS se llevó a cabo por voltamperometría cíclica. A través de la aplicación de un potencial en forma cíclica, en un intervalo de potencial negativo a uno positivo (anódico), o viceversa (catódico), se puede observar la oxidación y/o reducción correspondiente de alguna especie electroactiva dentro de ese intervalo (Figura 9). Como cada especie tiene un potencial de óxido-reducción (O/R) característico, el voltamperograma viene a ser como una huella dactilar del compuesto.



**Figura 9.** Voltamperograma de la AQDS (10 mM) en medio basal.  $E_{pa}$ , potencial del pico anódico (V);  $E_{pc}$ , potencial del pico catódico (V);  $i_{pa}$ , corriente anódica del pico ( $\mu$ A);  $i_{pc}$ , corriente catódica del pico ( $\mu$ A).  $E^{\circ'}$ , potencial de oxido-reducción (V).

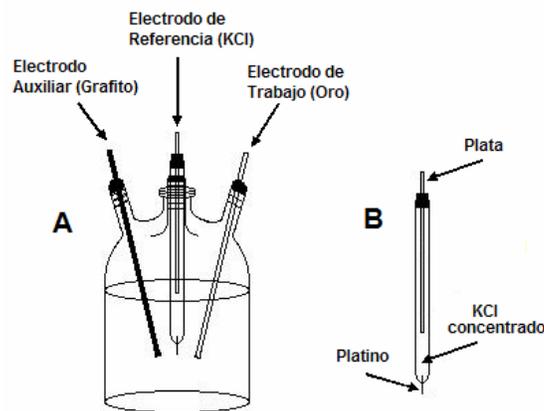
Se ha señalado que esta técnica es cuantitativa, ya que de acuerdo con la ecuación de Randles-Sevcik (Ecuación 6)(Van Benschoten y *col.*, 1983), donde  $i_p$ , corriente del pico;  $n$ , número de electrones estequiométricos;  $A$ , área del electrodo ( $\text{cm}^2$ );  $D$ , coeficiente de difusión ( $\text{cm}^2/\text{s}$ );  $C$ , la concentración ( $\text{mol}/\text{cm}^3$ ) y  $v$  es la velocidad de escaneo (V/s). De este modo,  $i_p$  incrementa con  $v^{1/2}$  y es directamente proporcional a la concentración (Kissinger y Heineman, 1983).

$$i_p = (2.65 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \dots\dots\dots (6)$$

La forma del voltamperograma (altura tanto del pico de oxidación como de reducción) viene dada, entre otras cosas, por la concentración de la especie

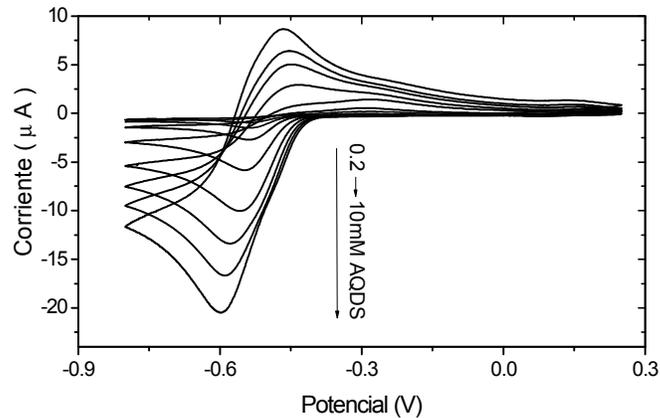
electro-activa. Así pues, diferentes concentraciones de la especie electro-activa cambian el perfil del voltamperograma (Figura 11)

Para medir la AH<sub>2</sub>QDS en los cultivos, a las botellas serológicas de 60 ml se le adaptaron tres entradas para los electrodos (Figura 10A). Como electrodo de trabajo se utilizaron alambres de oro de 10 cm de largo por 0.1 cm de ancho, recubiertos de teflón con un área de trabajo de  $3.15 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$ , como electrodo de referencia uno de Ag/AgCl/KCl y plata (Figura 10B) y como electrodo auxiliar se utilizó grafito de 4 cm de largo y 0.2 cm de ancho con una superficie de trabajo de  $12.6 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$ . Este sistema se diseñó con la finalidad de medir la reducción de la quinona a través del tiempo sin necesidad de abrir la botella.

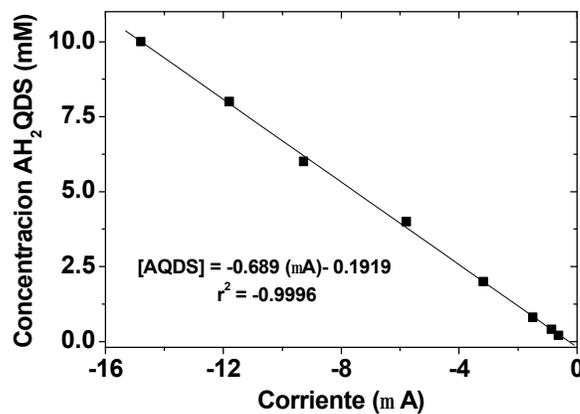


**Figura 10.** Sistema para medir la AH<sub>2</sub>QDS en cultivos desnitrificantes, A) Modelo de la botella serológica que se adaptó como celda electroquímica, con los electrodos respectivos, B) Modelo del electrodo de referencia.

De acuerdo con lo anterior se realizaron voltamperogramas a diferentes concentraciones de AQDS, en el medio basal definido anteriormente (Figura 11). De los voltamperogramas realizados para cada una de las concentraciones, se tomó la corriente a un voltaje de  $-0.75 \text{ V}$  en el barrido catódico. Este valor de corriente se linealizó con la concentración de quinona (Figura 12). En esta figura se ve claramente la respuesta lineal que se da con la corriente conforme la concentración de AQDS aumenta.



**Figura 11.** Voltamperogramas a diferentes concentraciones de AQDS en el medio basal desnitrificante (0.2, 0.4, 0.8, 2, 4, 6, 8, 10 mM).



**Figura 12 .** Corriente contra concentración de AQDS (Los valores de corriente fueron tomados a partir de los voltamperogramas a un potencial de -0.75 V, para todas las concentraciones).

La medición se llevó a cabo con un potencióstato/galvanostato AUTOLAB modelo PGSTAT30 con una velocidad de barrido de 0.1 V/s. Para caracterizar electroquímicamente la AQDS en el medio desnitrificante, se utilizó un electrodo de trabajo de oro (BAS Electrochemistry) con una área de trabajo de 0.20 cm<sup>2</sup>, un electrodo de referencia de KCl (Radiometer analytical), y como electrodo auxiliar uno grafito. Los cálculos de los potenciales de las quinonas ( $E^\circ$ ) se realizaron de acuerdo a la ecuación de la Figura 9.

---

## **Capítulo 4**

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

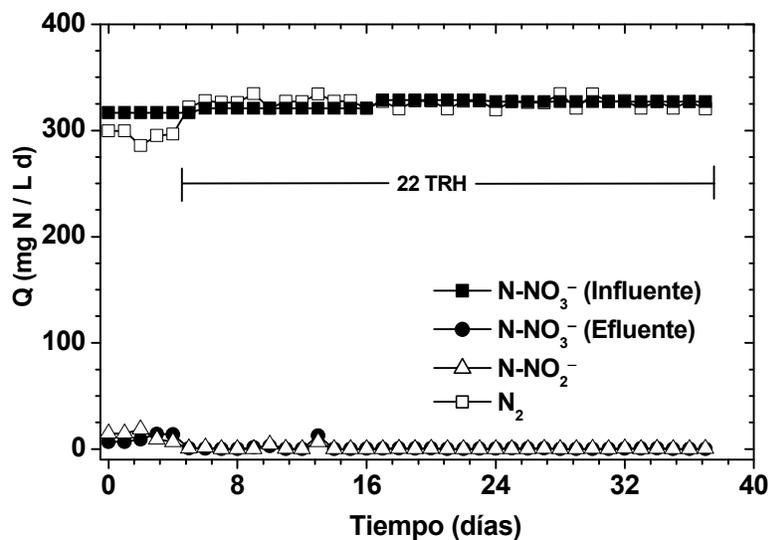
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Obtención del inóculo desnitrificante fisiológicamente estable para las cinéticas en lote

#### 4.1.1 Estabilización del lodo bajo condiciones desasimilativas

El reactor continuo desnitrificante presentó los perfiles mostrados en las Figuras 13 y 14. Un resumen de las variables de respuesta se presenta en la Tabla 10.

Como se puede observar en la Figura 13, durante 22 veces el tiempo de residencia hidráulica (TRH), el reactor desnitrificante mostró un perfil constante para las velocidades de carga y descarga de los compuestos nitrogenados. La velocidad de descarga de nitrato en el efluente fue muy baja ( $Q_{N-NO_3(\text{efluente})} = 0.8 \pm 3.2 \text{ mg/Ld}$ ), así como la producción de nitrito ( $Q_{N-NO_2(\text{efluente})} = 0.5 \pm 1.4 \text{ mg/Ld}$ ). No se detectó amonio, tampoco intermediarios de la desnitrificación como el óxido nitroso. Se obtuvo una eficiencia de consumo de nitrógeno en forma de nitrato ( $E_{NO_3}$ ) del 100 %. El nitrógeno consumido se recuperó a la salida del reactor en forma de nitrógeno molecular, obteniendo un rendimiento de producción de  $N_2$  ( $Y_{N_2}$ ) de 1.



**Figura 13.** Perfil de las velocidades de carga y descarga de los compuestos nitrogenados en el reactor continuo desnitrificante.

El reactor desnitrificante mostró un perfil constante para las velocidades de carga y descarga de los compuestos carbonados, durante 22 veces el TRH (Figura 14). La velocidad de descarga de acetato fue muy baja ( $Q_{C-act (efluente)} = 6.1 \pm 3.6 \text{ mg/Ld}$ ). No se detectó metano en el efluente gaseoso. Se obtuvo una eficiencia de consumo de carbono en forma de acetato ( $E_{acetato}$ ) del 99%. El carbono consumido se recuperó en el efluente en forma de carbono inorgánico con un rendimiento ( $Y_{HCO_3}$ ) de 0.99. El valor promedio de pH en este tiempo fue de  $9.08 \pm 0.14$ .

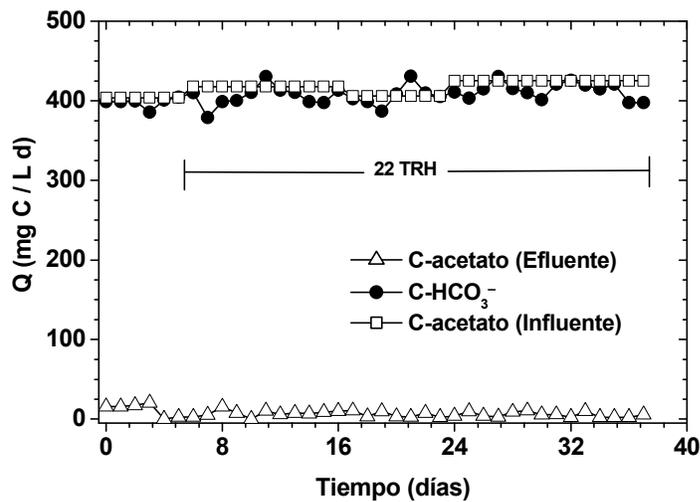


Figura 14. Perfil de las velocidades de carga y descarga de los compuestos carbonados en el reactor continuo desnitrificante.

Tabla 10. Velocidades de carga y descarga, rendimientos y eficiencias de consumo en el reactor continuo desnitrificante.

NITROGENO		CARBONO	
$Q_{N-NO_3}$ Entrada	$324.9 \pm 3.6 \text{ mg N/L.d}$	$Q_{C-act}$ Entrada	$418 \pm 7.8 \text{ mg C/L.d}$
$Q_{N-N_2}$ Salida	$326.1 \pm 4.4 \text{ mg N/L.d}$	$Q_{HCO_3}$ Salida	$415 \pm 11.8 \text{ mg C/L.d}$
$Y_{N_2}$	$1 \pm 0.02$	$Y_{HCO_3}$	$0.99 \pm 0.04$
$E_{NO_3}$	$100 \pm 2 \%$	$E_{acetato}$	$99.3 \pm 2.9 \%$

Dado que las variables de respuesta para los compuestos tanto, nitrogenados como carbonados, se mantuvieron constantes durante 22 veces el TRH y que no fue detectable la formación de lodo en ese periodo, es posible decir

que el reactor desnitrificante se mantuvo en estado estacionario y operó en condiciones netamente desasimilativas.

#### 4.1.2 Crecimiento del lodo como fuente de inóculo

Una vez comprobado que el lodo desnitrificante presentó un estado fisiológico constante, se procedió a cambiar la C/N para pasar a un proceso menos desasimilativo y producir más biomasa microbiana. La C/N se incrementó a 1.8 y la concentración de  $MgSO_4(7H_2O)$  se aumentó a 1.2 g/L. La velocidad de carga de  $N-NO_3^-$  se mantuvo constante en 250 mg N/L\*d.

El reactor se operó bajo estas condiciones hasta que se alcanzó el nuevo estado estacionario desnitrificante. La eficiencia de consumo para el nitrato ( $E_{NO_3}$ ) fue de 99.8% con un rendimiento desnitrificante ( $Y_{N_2}$ ) de 0.7. La eficiencia de consumo de carbono ( $E_{acetato}$ ) fue de 89.23% con un rendimiento en la producción de carbono inorgánico ( $Y_{HCO_3}$ ) de 0.67. El rendimiento de crecimiento de biomasa ( $Y_{BM}$ ) fue de 0.19. Abajo se presentan las velocidades de carga y los balances de materia para el nitrógeno y carbono que se presentaron durante 10 veces el TRH (Ecuaciones 7 y 8).

**Balance de materia de nitrógeno:**

$$Q_{N-NO_3} (\text{influyente}) = Q_{N-NO_3} (\text{efluente}) + Q_{N-NO_2} + Q_{N_2} + Q_{N-NH_4} + Q_{N-Biomasa} \dots\dots\dots (7)$$

$$252 \pm 10 \text{ mg/L}_d = 0.6 \pm 0.5 \text{ mg/L}_d + 0.13 \pm 0.1 \text{ mg/L}_d + 178 \pm 15 \text{ mg/L}_d$$

$$+ 32 \pm 6 \text{ mg/L}_d + 17.4 \pm 1.5 \text{ mg/L}_d$$

**Balance de materia de carbono:**

$$Q_{C-Acetato} (\text{influyente}) = Q_{C-Acetato} (\text{efluente}) + Q_{C-HCO_3} + Q_{C-Biomasa} \dots\dots\dots (8)$$

$$468 \pm 11 \text{ mg/L}_d = 50 \pm 1.2 \text{ mg/L}_d + 315 \pm 5.8 \text{ mg/L}_d + 87.1 \pm 7.7 \text{ mg/L}_d$$

Estos balances son muy cerrados, tanto para el nitrógeno como para el carbono. Con esto se presenta evidencia de que el reactor continuo desnitrificante alcanzó de nuevo el estado estacionario bajo condiciones semidesasimilativas. El lodo utilizado para inocular los cultivos en lote fue producido continuamente bajo estas mismas condiciones.

## 4.2 Estudio en lote del efecto de la AQDS en la oxidación de MO por un lodo desnitrificante

### 4.2.1 Oxidación de materia orgánica con quinonas

En esta primera parte se pretendió evaluar el efecto que tienen las quinonas en la oxidación anaerobia de materia orgánica (MO) por un lodo con un historial desnitrificante. Se realizaron estudios cinéticos en lote en los cuales se probaron dos fuentes orgánicas reductoras diferentes (acetato y *p*-cresol) y dos fuentes oxidantes ( $\text{NO}_3^-$  y AQDS).

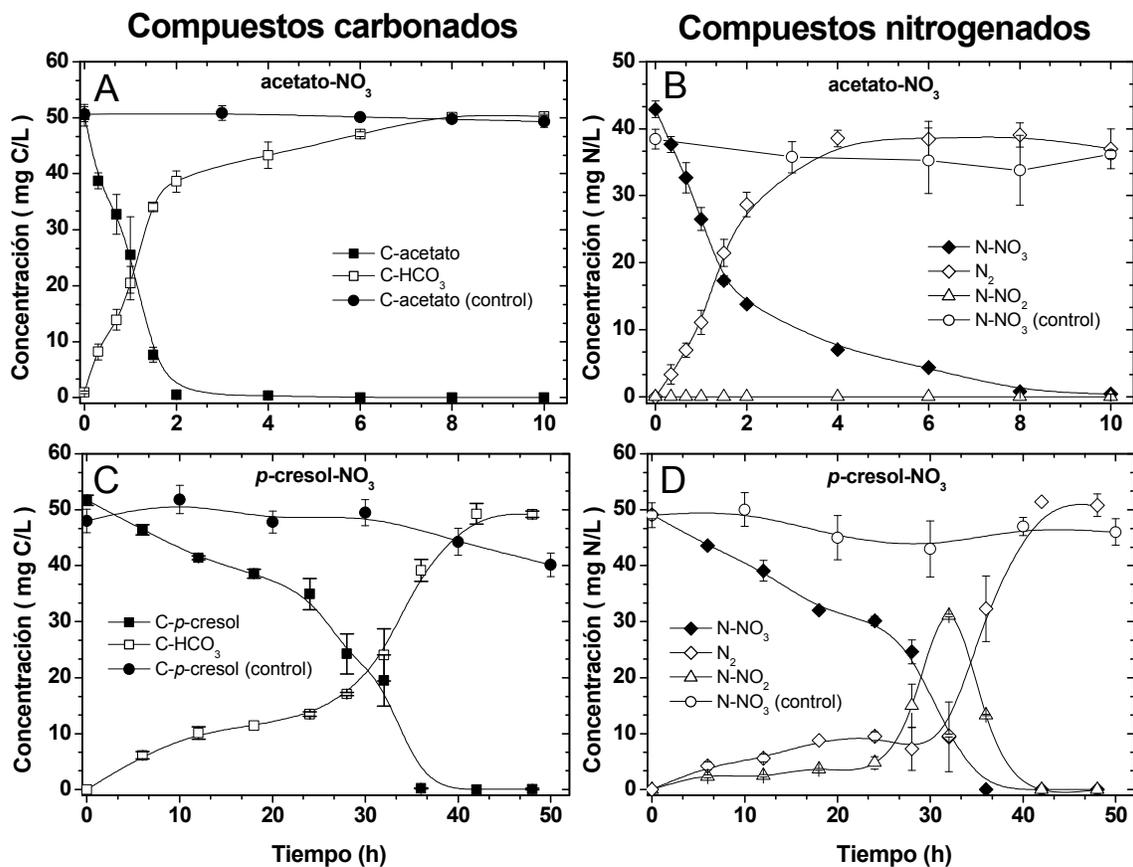
#### 4.2.1.1 Nitrato como aceptor final de electrones

Para observar el papel de la fuente oxidante en el proceso de oxidación, primero se utilizó al  $\text{NO}_3^-$  con el acetato. En la Figura 15A se muestra el perfil de consumo de C-acetato, el cual terminó aproximadamente a las 2 h y se recuperó en forma de C- $\text{HCO}_3^-$  a las 8 h. La eficiencia de consumo de acetato fue del  $99 \pm 2\%$  con un rendimiento de producción de carbono inorgánico de  $0.98 \pm 0.04$ . El nitrato se consumió completamente a las 10 h y el producto final de su reducción fue el  $\text{N}_2$  ya que no se presentó nitrito como intermediario (Figura 15B). La eficiencia de consumo de nitrato fue del  $99.1 \pm 1.4\%$  con un rendimiento desnitrificante del  $0.95 \pm 0.04$ . El control con inóculo estéril que contuvo  $\text{NO}_3^-$  y acetato, no presentó consumo significativo (Figura 15A y B). Los controles que sólo contenían al acetato con el inóculo y al nitrato con el inóculo, tampoco presentaron variaciones en las variables de respuesta. El pH final del cultivo fue de  $7.68 \pm 0.2$ .

No hay un proceso simultáneo entre la desaparición del acetato y la formación de carbono inorgánico, pero sí lo hay entre la formación del  $\text{HCO}_3^-$  con la de nitrógeno molecular, que a su vez se acopla a la reducción de nitrato. Una posible explicación es el hecho de que la concentración del inóculo fue alta (1 g de SSV/L), mientras que la de carbono de acetato fue de 50 mg/L, y pareciera que el acetato se consumió completamente a las dos horas y luego se fue oxidando

paulatinamente. O bien, es posible que se oxidara, pero que el transporte de electrones provenientes de su oxidación, hacia el nitrato, fuera lento.

Con lo anterior se probó que el lodo que provenía de un cultivo en continuo desnitrificante era capaz de desnitrificar en lote, y por consiguiente se procedió a ensayar un compuesto recalcitrante (que fue el *p*-cresol) con  $\text{NO}_3^-$ . La figura 15C muestra el consumo del *p*-cresol cuyo proceso completo de oxidación se tardó aproximadamente 36 h con una eficiencia de consumo de  $99.8 \pm 0.3\%$ . Todo el carbono oxidado se recuperó en forma de  $\text{HCO}_3^-$  con un rendimiento de  $0.96 \pm 0.04$ .



**Figura 15.** Ensayos con nitrato como aceptor final de electrones. A) Perfiles de consumo de acetato y producción de  $\text{HCO}_3^-$ , B) Compuestos nitrogenados: acetato y  $\text{NO}_3^-$ , C) Perfil de los compuestos carbonados del *p*-cresol con  $\text{NO}_3^-$ , D) Compuestos nitrogenados: *p*-cresol con  $\text{NO}_3^-$ . Los controles presentados corresponden a los que contenían la MO con el  $\text{NO}_3^-$  y el inóculo estéril.

El nitrato se consumió completamente también a las 36 h (Figura 15D). Pero, respecto del ensayo donde se utilizó al acetato, aquí sí se presentó acumulación de nitrito, el cual alcanzó una concentración máxima de 32 mg N-NO<sub>2</sub>/L a las 32 h. Luego es nula a partir de las 42 h ( $E_{\text{NO}_3^-} = 100 \pm 0 \%$ ). Se obtuvo todo el nitrato reducido en forma de N<sub>2</sub> a las 42 h con un rendimiento desnitrificante de  $1 \pm 0.02$ . El control con inóculo estéril, con sólo NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y *p*-cresol, no presentó consumo significativo (Figura 15 C y D). Los controles que sólo contenían al *p*-cresol con el inóculo y al nitrato con el inóculo tampoco presentaron cambios significativos. El pH final del ensayo fue de  $7.73 \pm 0.1$ .

Parece que hay una fase de retardo de 24 h en la oxidación de *p*-cresol que después decae más rápidamente. En esa etapa de consumo lineal es cuando se forma la mayor parte del nitrito. Una posible explicación a este comportamiento es la formación de intermediarios de la oxidación del *p*-cresol. Algunos autores han observado la presencia de intermediarios transitorios en la oxidación del *p*-cresol (no medidos) bajo condiciones desnitrificantes, así como la formación de nitrito (Bossert y Young, 1986; Haggblom y col., 1990; Spence y col., 2001). En este ensayo el lodo demostró ser capaz de utilizar al *p*-cresol como fuente de electrones en el proceso desnitrificante.

El proceso desnitrificante se completó para ambas fuentes reductoras (acetato y *p*-cresol) de acuerdo a las estequiometrías correspondientes (Tabla 4(1 y 3)). No se detectaron cambios en la concentración de SSV al final de cada ensayo. En consecuencia, se puede inferir que estos cultivos en lote se llevaron en condiciones netamente desasimilativas.

En las Figuras 15A y C, como en la Tabla 11 se puede observar globalmente la diferencia en el comportamiento del lodo, al usar la misma concentración de carbono, pero con compuestos orgánicos de una estructura química diferente.

La MO cuya estructura química es compleja (PAH's, PCB's, BTX, compuestos fenólicos, etc.) suele llamarse recalcitrante porque para que pueda ser oxidada biológicamente, se necesita de toda una maquinaria enzimática

compleja que suele ser diferente para cada compuesto (Hollinger y *col.*, 1988). Eso implica que no se oxida bajo la misma vía metabólica ni con la misma velocidad que la MO más fácilmente biodegradable.

A pesar de que el historial fisiológico influye también en el comportamiento del cultivo, las velocidades específicas de consumo dan un panorama de como la estructura de la fuente de electrones puede influir en su velocidad de oxidación. En la Tabla 11, se observa que la oxidación del *p*-cresol (MO recalcitrante) por desnitrificación es lenta. De ahí que se intente probar a la quinona AQDS como coadyuvante en el transporte de electrones y el proceso desnitrificante.

**Tabla 11.** Velocidades específicas de consumo de *p*-cresol y acetato, con nitrato como aceptor final de electrones

Donador de e <sup>-</sup>	Velocidad mgC /mg SSV.h
<i>p</i> -cresol	2.84 x 10 <sup>-3</sup>
acetato	25.2 x 10 <sup>-3</sup>

#### 4.2.1.2 AQDS como aceptor final de electrones

Una vez ensayado el nitrato como poder oxidante en la oxidación anaerobia de MO, se procedió a cambiar el aceptor de electrones por la quinona AQDS. Se realizaron estudios cinéticos de la oxidación del acetato y del *p*-cresol donde la quinona fungiera el papel de aceptor final de electrones, con la finalidad de determinar si el lodo desnitrificante presentaba la capacidad de reducir la AQDS, vía oxidación de MO. Existe evidencia del papel oxidante de la AQDS en la oxidación del acetato a CO<sub>2</sub> pero con un lodo metanogénico y cultivos puros (Scott y *col.*, 1998; Cervantes y *col.*, 2000c). Anteriormente, Cervantes y *col.* (2000b) presentaron evidencia de que los compuestos fenólicos (fenol y *p*-cresol) pueden ser oxidados a CO<sub>2</sub> con la AQDS mediante un lodo metanogénico.

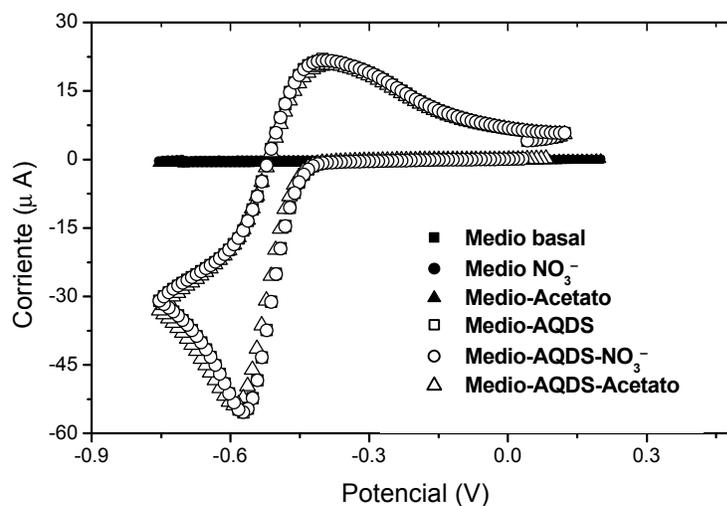
Algunos autores han presentado evidencia de que existe una amplia diversidad de microorganismos capaces de reducir quinona así como al humus (Newman y Kolter, 2000; Cervantes, 2002; Coates y *col.*, 2002). Existen algunos

reportes en los cuales se observa que algunos microorganismos desnitrificantes, son capaces de utilizar AQDS, pero sólo como donador de electrones (Lovley y *col.*, 1999; Coates y *col.*, 2002).

Antes de realizar los ensayos en lote con AQDS se realizó una caracterización electroquímica de la quinona bajo las condiciones experimentales utilizadas en los cultivos en lote.

#### 4.2.1.2.1 Caracterización Electroquímica de la AQDS en el medio de trabajo.

Para poder medir por electroquímica la reducción de la AQDS, en los cultivos desnitrificantes se realizaron primero algunas pruebas para verificar si no había interferencia con algún componente del medio de cultivo. Se realizaron voltamperogramas del medio basal solo, medio- $\text{NO}_3^-$ , medio-acetato, medio-AQDS, medio- $\text{NO}_3^-$ -AQDS, medio-acetato-AQDS que se pueden observar en la Figura 16.



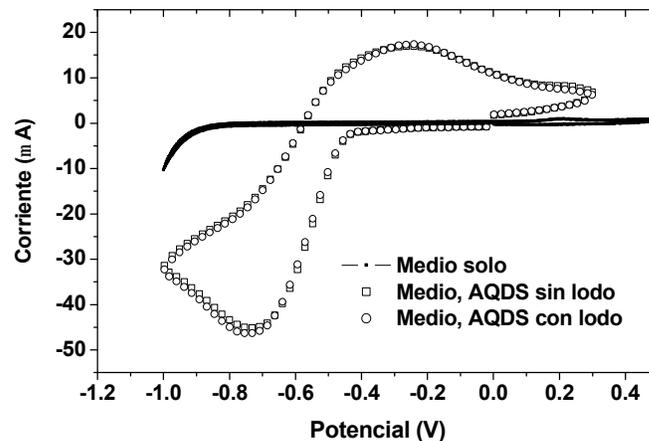
**Figura 16.** Voltamperogramas del medio de cultivo desnitrificante con diferentes combinaciones de los componentes de interés: nitrato, acetato y AQDS.

El medio basal a pesar de tener componentes como el cloruro férrico, no presentó alguna especie electro-activa, cuyo potencial de oxidación y/o reducción estuviera dentro del intervalo de potencial utilizado para medir a la AQDS (-0.8 V a +0.2 V). La presencia de  $\text{NO}_3^-$  o acetato en el medio tampoco generó ninguna diferencia en los voltamperogramas del medio en ausencia de la quinona. Los voltamperogramas obtenidos con AQDS no presentaron ninguna diferencia

significativa cuando el nitrato o el acetato estuvieron presentes en el medio. Estos resultados muestran que los componentes del medio de cultivo, el nitrato y el acetato no interfieren la forma del voltamperograma de la AQDS, al no haber cambios en la reversibilidad del pico tanto de oxidación como de reducción. Se pudo constatar que la AQDS se mide, sin interferencia del medio de cultivo por el método electroquímico.

Del voltamperograma obtenido característico con AQDS, se pudo determinar el potencial redox del par redox (AQDS/AH<sub>2</sub>QDS), bajo las condiciones experimentales utilizadas con un valor de -532 mV para el electrodo de referencia de KCl/Plata.

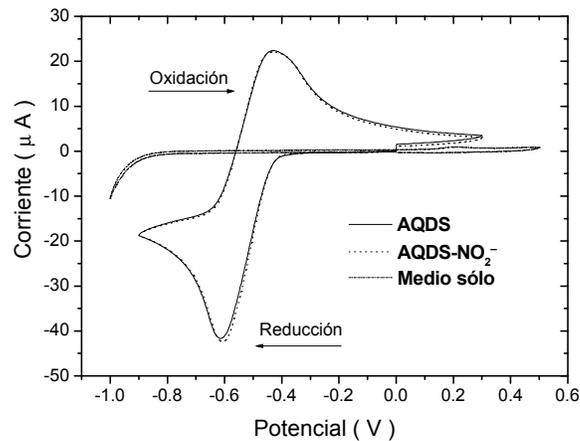
Se evaluó también el efecto del lodo en los voltamperogramas con AQDS (Figura 17). Se puede observar que el lodo no provoca ninguna interferencia en la reversibilidad del voltamperograma con AQDS indicando que no presenta ninguna reacción con la quinona y, por consiguiente, no interfiere en la determinación de la AH<sub>2</sub>QDS.



**Figura 17.** Voltamperogramas del medio de cultivo con AQDS en presencia de lodo.

En los ensayos posteriores donde se probaría a la AQDS en cultivos desnitrificantes con NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y MO, existe la posibilidad de que hubiera formación de nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), el cual podría reaccionar con la quinona reducida (AH<sub>2</sub>QDS), si es que esta se llegara a formar. En efecto, el potencial de óxido reducción (O/R) (E°) del par NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO es +337 mV (con respecto al electrodo de hidrógeno) mientras que el potencial de la AQDS/AH<sub>2</sub>QDS es de -180 mV (con respecto al electrodo de

hidrógeno). Por lo cual se evaluó electroquímicamente el medio de cultivo con quinona en ausencia y presencia de nitrito (Figura 18).



**Figura 18.** Voltamperogramas del medio de cultivo desnitrificante, en presencia de quinona y en presencia de quinona con nitrito.

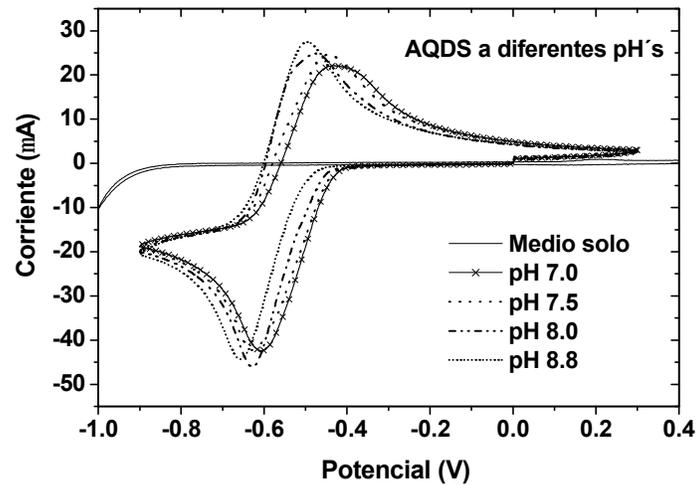
Estos resultados muestran que el nitrito no interfiere con la quinona reducida. Los picos de oxidación y reducción de la AQDS son similares en presencia de nitrito y sin el, por lo cual la reversibilidad del voltamperograma fue completa. En caso de que la  $AH_2QDS$  hubiera reaccionado con el nitrito, el pico de oxidación hubiera sido menor.

El potencial de O/R de una especie electro-activa depende entre otras cosas del valor del pH en el medio, por lo cual también se evaluó el efecto del pH en el potencial de O/R de la AQDS/ $AH_2QDS$ . No se usó un sistema de amortiguamiento en los cultivos y el valor de pH aumento de 7 a 7.8 en promedio en el transcurso de los experimentos. Los resultados se muestran en la Figura 19, en donde se puede observar que conforme aumenta el pH, hay un pequeño corrimiento del voltamperograma hacia potenciales mas negativos. Se calcularon los potenciales de media onda con el fin de determinar la magnitud del cambio del potencial con el pH (Tabla 12).

**Tabla 12.** Potenciales de oxido-reducción de la AQDS/ $AH_2QDS$  a diferentes valores de pH.

pH	$E^\circ$ (mV)	pH	$E^\circ$ (mV)
7.0	-532	8.0	-552
7.5	-536	8.8	-578

De acuerdo con los resultados de la Tabla 12 conforme se incrementa el pH decrece el potencial de O/R. Sin embargo, en el intervalo de pH de 7.0 a 8.8 el potencial sólo varió de 8 %, por lo cual se puede decir que en este intervalo de pH, el valor del potencial de O/R no presenta un cambio significativo.



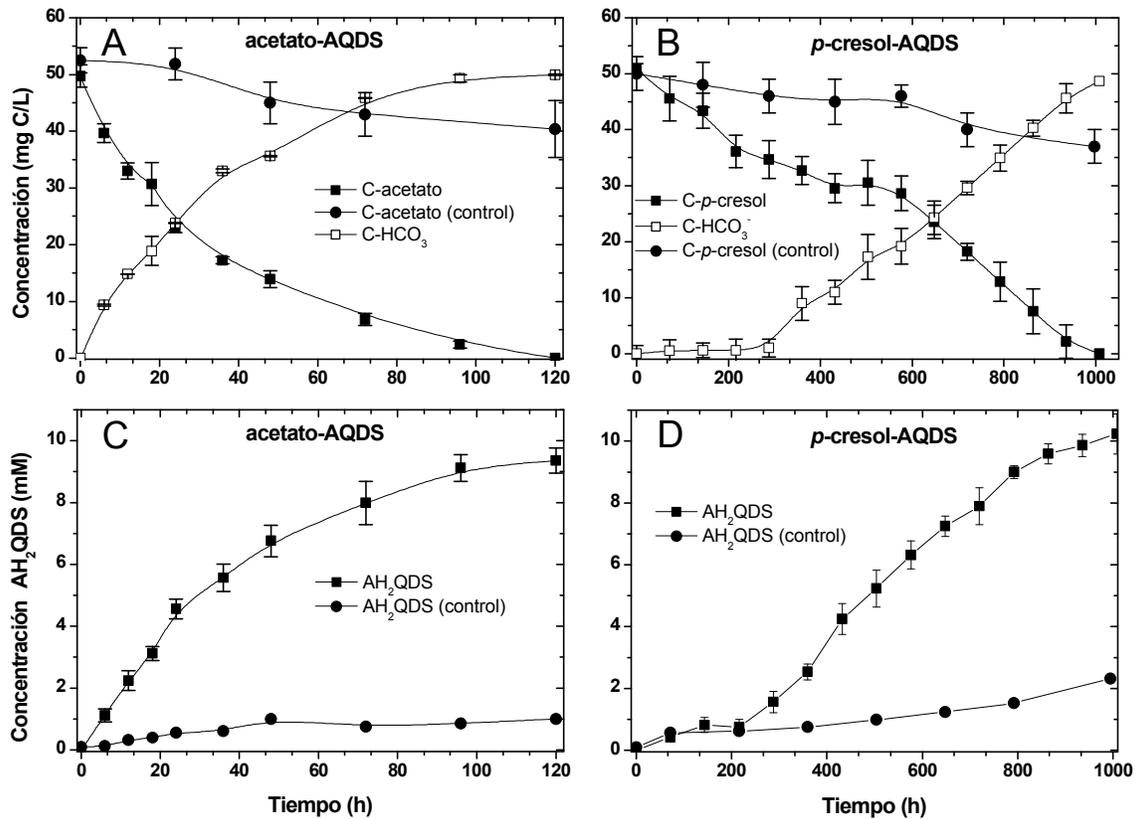
**Figura 19.** Voltamperogramas de la AQDS en el medio de cultivo desnitrificante a diferentes valores de pH.

#### 4.2.1.2.2 Oxidación de materia orgánica con AQDS

En la Figura 20 se puede establecer qué papel jugó la AQDS, en la oxidación de acetato y *p*-cresol. Los controles que se ven en las Figuras 20A y B corresponden a los cultivos con acetato y *p*-cresol respectivamente, con el inóculo, pero sin AQDS. En estos controles se presentó un consumo de 12 mg C/L para el acetato y 13 mg C/L para el *p*-cresol al final de cada ensayo. Los controles de las Figuras 20C (acetato) y 20D (*p*-cresol) corresponden a los cultivos con el inóculo y la quinona sin MO. En estos controles hubo una producción de AH<sub>2</sub>QDS de 1.8 mM para el acetato y 2.3 mM para el *p*-cresol. Estos valores presentados por los controles son pequeños y podría atribuirse al metabolismo endógeno. Los controles estériles no mostraron un consumo significativo de ambas fuentes de carbono, ni de la AQDS.

Cuando la AQDS estuvo presente, el carbono oxidado se recuperó en forma de carbono inorgánico, en ambos casos (Figuras 20A y 20B). Para el acetato se obtuvo una eficiencia de consumo de carbono del 100% y un rendimiento de producción en HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de  $1 \pm 0.01$ . La AQDS se redujo a AH<sub>2</sub>QDS estequiométricamente (Tabla 4(2)) con la oxidación de acetato (pH final =  $7.51 \pm 0.2$ ) (Figura 20C). Para el *p*-cresol se obtuvo una eficiencia de consumo de carbono del 100 % con un rendimiento de producción en HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de  $0.96 \pm 0.05$ . Con la oxidación del *p*-cresol también se redujo estequiométricamente (Tabla 4(4)) la AQDS a AH<sub>2</sub>QDS (pH final =  $7.73 \pm 0.07$ ).

Estos resultados dejan evidencia de que el lodo proveniente del reactor desnitrificante en estado estacionario, fue capaz, no sólo de dar una respuesta fisiológica a la presencia de AQDS, sino también de reducir a la quinona, vía la oxidación de la materia orgánica; sea fácil de oxidar como el acetato, o recalcitrante como el *p*-cresol.



**Figura 20.** Cinéticas de oxidación de MO por un lodo desnitrificante con AQDS como aceptor de electrones en sustitución de nitrato. A) Con el acetato como donador de electrones, B) con el *p*-cresol como donador de electrones. C) AQDS reducida formada con acetato, D) Cinética de formación de AH<sub>2</sub>QDS con *p*-cresol.

Entre las Figuras 20A y 20B se puede observar claramente una diferencia notable entre los dos cultivos, ya que la oxidación completa del *p*-cresol se realizó en aproximadamente 1000 h (45 días), mientras que la del acetato en sólo 120 h (5 días). Un mejor ejemplo de la magnitud de esta diferencia son las velocidades específicas de consumo de ambas especies carbonadas (Tabla 13), donde se puede ver una diferencia de aproximadamente 1 orden de magnitud.

**Tabla 13.** Velocidades específicas de consumo de carbono de *p*-cresol y de acetato, con AQDS como aceptor final de electrones.

Donador de electrones	Velocidad mgC /mg SSV.h
Acetato	0.21 x 10 <sup>-3</sup>
<i>p</i> -cresol	0.04 x 10 <sup>-3</sup>

Cabe decir que el carbono inorgánico se va formando a la par de la oxidación del acetato hasta el final del proceso, mientras que con el *p*-cresol no sucede lo mismo. En este caso el carbono inorgánico empieza a aparecer a partir de las 250 h. Lo que podría atribuirse en parte a la formación de intermediarios del *p*-cresol (Bossert y Young, 1986; Haggblom y *col*, 1990; Spence y *col*, 2001).

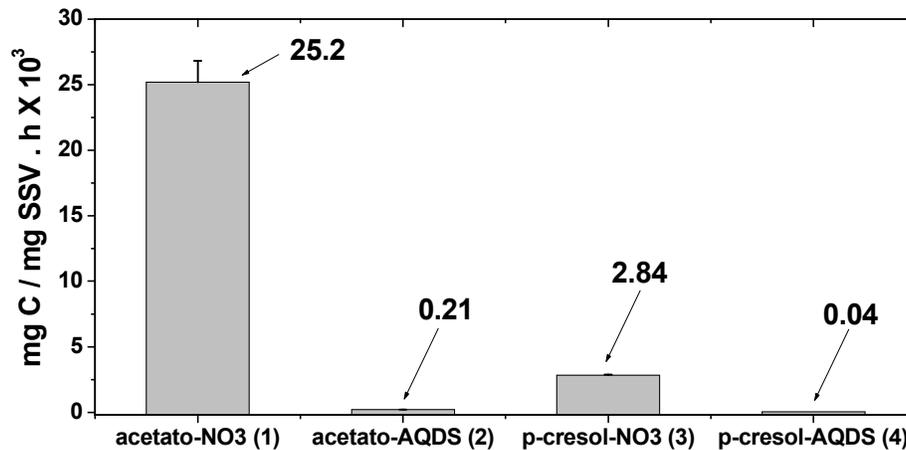
De igual manera sucede con la formación de AH<sub>2</sub>QDS. La cual se va formando acoplada a la oxidación de acetato y a la producción de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figuras 20A y 20C). Sin embargo, para el *p*-cresol, la formación de AH<sub>2</sub>QDS no se ve acoplada a la oxidación del compuesto carbonado (Figura 20B y 20D), pero si parece acoplarse a la formación de carbono inorgánico. Estas observaciones respaldarían la hipótesis de la formación de intermediarios del *p*-cresol en el cultivo desnitrificante. El *p*-cresol pudiera ser oxidado paulatinamente a algunos intermediarios, los cuales después pudieran ser consumidos por el lodo desnitrificante. Por eso tal vez se ve el repunte en la producción de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y de AH<sub>2</sub>QDS, alrededor de las 250 h de transcurrido el ensayo.

Se tienen dos posibles opciones para entender estas diferencias en las cinéticas con acetato y *p*-cresol. Una es, que el inóculo no había estado antes expuesto al *p*-cresol, tuvo que adecuarse a la presencia de este compuesto para poder oxidarlo; esto es, sintetizar o activar toda la maquinaria enzimática necesaria. Se presenta un tipo de fase de retardo de hasta 600 h, en la oxidación del compuesto carbonado recalcitrante.

La otra posible explicación es que durante la oxidación del *p*-cresol a algún intermediario se acumula la energía necesaria para después romper el anillo aromático del *p*-cresol y así terminar de metabolizarlo a CO<sub>2</sub>. Esto también explicaría el por qué se torna tan lento con respecto al acetato (Tabla 13). Aquí se puede recalcar al papel que juega la estructura química de los compuestos carbonados, así como el historial fisiológico del lodo, en la cinética de oxidación de MO recalcitrante.

#### 4.2.1.3 AQDS versus Nitrato como potenciales oxidantes

Como se señaló anteriormente, se probaron dos aceptores de electrones (AQDS y  $\text{NO}_3^-$ ) para observar el papel de la quinona en la oxidación de la MO. Como punto de partida para la discusión se calcularon las velocidades específicas de consumo de las fuentes carbonadas, las cuales se comparan en la Figura 21.



**Figura 21.** Velocidades específicas de consumo del acetato y de *p*-cresol por un lodo desnitrificante con diferentes aceptores de electrones:  $\text{NO}_3^-$  (1 y 3) y AQDS (2 y 4).

Es contundente que el proceso desnitrificante es más rápido para ambas fuentes reductoras que el proceso de oxidación por medio de la quinona. Una forma de tratar de entender estos resultados puede ser a partir de los potenciales de O/R. Varios investigadores resaltan el posible papel que juega el potencial de O/R de los aceptores finales de electrones en la oxidación de MO (Brock y Madigan, 1991; Field y *col.*, 2000; Rau y *col.*, 2002). El potencial de O/R reportado para el par AQDS/AH<sub>2</sub>QDS es de  $E^{\circ'} = -184$  mV (con respecto al electrodo de hidrógeno) (Benz y *col.*, 1998) mientras que el potencial del par  $\text{NO}_3^-/\text{N}_2$  es de  $E^{\circ'} = +741$  mV (con respecto al electrodo de hidrógeno) (Smith y Arah, 1986). Es un hecho que este tipo de información sólo nos dice que la oxidación de MO por desnitrificación es más favorable termodinámicamente que mediante la reducción de AQDS a AH<sub>2</sub>QDS, lo cual se respalda con las energías libres de Gibbs (Tabla 4). Pero no explica por qué se lleva a cabo con mayor velocidad.

La otra posible explicación de por qué se lleva a cabo con mayor rapidez la desnitrificación es el nivel al cuál se lleva a cabo la reducción del aceptor de

electrones, desde el punto de vista fisiológico. Mientras que el nitrato se reduce a nivel del periplasma, se ha reportado que la reducción de la AQDS se lleva a cabo a nivel extracelular (Hernandez y Newman, 2001). El transporte de electrones en estos dos niveles es diferente, lo cual se vería reflejado en la velocidad de reducción y por consecuencia de oxidación de la fuente de energía.

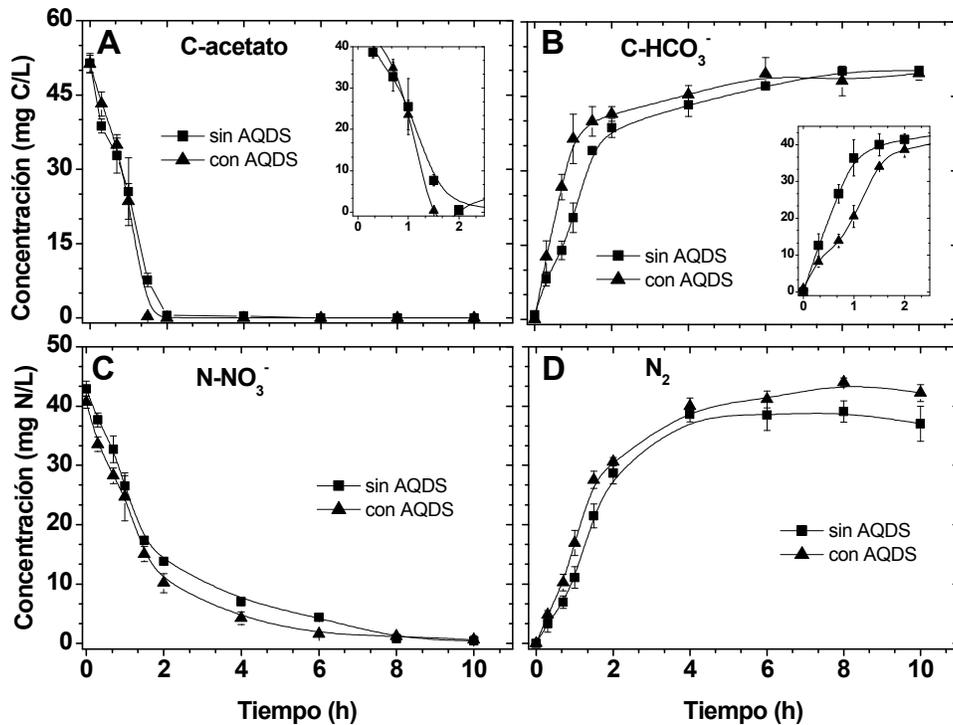
#### **4.2.2 Efecto de la quinona en la oxidación de MO durante el proceso desnitrificante.**

Field y *col.* (2000) remarcan que hay tres papeles importantes que la quinona AQDS puede tener en sistemas biológicos. El primero, es la función que puede tener como aceptor final de electrones en la oxidación de materia orgánica de diferentes tipos. El segundo, es como mediador redox, o bien transportador de electrones, lo cual se ha reportado en la transformación de compuestos nitroaromáticos, policlorados y/o colorantes azóicos. Por último, es el papel de donador de electrones que se ha encontrado en procesos de reducción con nitrato, fumarato y perclorato. La AQDS ya se ha observado como donador de electrones en los procesos desnitrificantes (Lovley y *col.*, 1999a; Coates y *col.*, 2002). Cabe mencionar que se ha reportado que existe una gran diversidad de microorganismos capaces de utilizar la AQDS/AH<sub>2</sub>QDS (Coates y *col.*, 1998, 2002). Existen microorganismos reductores de AQDS y microorganismos oxidantes de AH<sub>2</sub>QDS. Sin embargo, no todos pueden llevar a cabo simultáneamente la oxidoreducción de la quinona como mediador redox. La mayoría de los trabajos reportados en la literatura fueron realizados con cultivos axénicos.

Los resultados obtenidos en este trabajo evidencian por primera vez que la AQDS se puede utilizar como aceptor final de electrones en la oxidación de MO por un consorcio desnitrificante. Falta entonces saber si se puede utilizar la AQDS como transportador de electrones, de tal modo que se incremente la velocidad de oxidación de la MO con la reducción de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a N<sub>2</sub>.

##### **4.2.2.1 La AQDS en la desnitrificación con acetato**

Una vez comprobado que el lodo desnitrificante fue capaz de utilizar la AQDS como aceptor de electrones en la oxidación de MO, se procedió a hacer ensayos de desnitrificación en presencia de AQDS. Los resultados se presentan en la Figura 22:



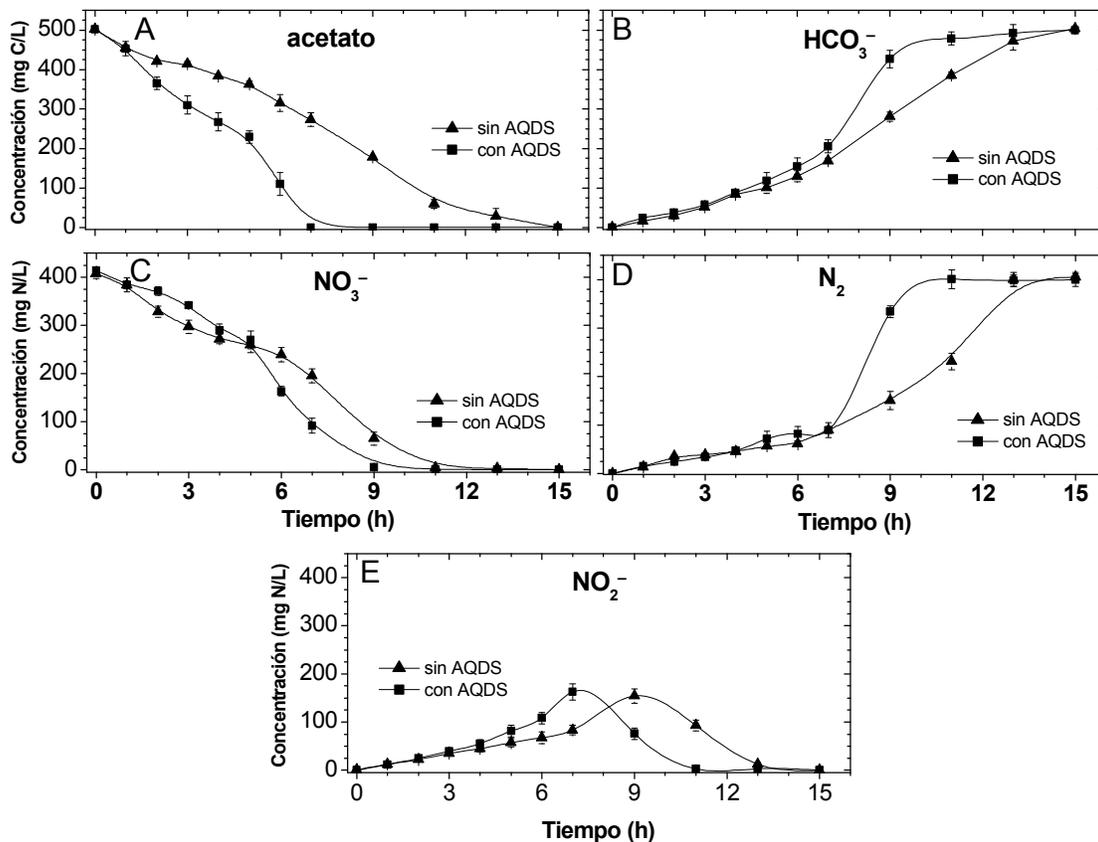
**Figura 22.** Comparación de los perfiles de consumo y de producción de los compuestos carbonados y nitrogenados, en cultivos desnitrificantes en ausencia y en presencia de AQDS.

Se observa que el perfil cinético de oxidación de acetato bajo condiciones desnitrificantes, en presencia de AQDS, es aparentemente muy parecido a cuando la AQDS no fue suplementada. Sin embargo, hay que notar que el acetato desapareció completamente en 1.5 h en presencia de quinona, mientras que el proceso sin AQDS finalizó en 2 h. Este resultado se corrobora con la producción de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figura 22B), ya que a las 1.5 h, se alcanzó una concentración de carbono inorgánico de  $40.0 \pm 3.0$  mg C/L con AQDS y  $34.1 \pm 0.7$  mg C/L sin AQDS. En el ensayo donde se encontraba presente la AQDS se ve claramente que la concentración de N<sub>2</sub> fue mayor a las 1.5 h (Figura 22D). No se detectó presencia de nitrito. Se calcularon las velocidades específicas de consumo de acetato y de nitrato y se compararon (Tabla 14). Un análisis estadístico (ANOVA de una vía) de las medias de las velocidades específicas de consumo de acetato con y sin AQDS muestra que son significativamente diferentes (con un nivel de significancia de 0.017); sin embargo las velocidades de consumo de nitrato no presentaron diferencia significativa.

**Tabla 14.** Velocidades específicas de consumo de acetato y de nitrato en cultivos desnitrificantes con y sin quinona.

Ensayo	mg C-acetato/mg SSV.h	mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /mg SSV.h
Con AQDS	$3.4 \times 10^{-2} \pm 1.4 \times 10^{-3}$	$1.7 \times 10^{-2} \pm 1.0 \times 10^{-3}$
Sin AQDS	$2.7 \times 10^{-2} \pm 2.0 \times 10^{-4}$	$1.5 \times 10^{-2} \pm 1.8 \times 10^{-4}$

Estos primeros resultados parecen indicar que la presencia de la AQDS en el cultivo desnitrificante tiende a aumentar las velocidades de oxidación de acetato y de desnitrificación (21% mayor con AQDS que sin ella). Sin embargo las diferencias que se presentan no son claras, especialmente en la desaparición de nitrato, así que se llevó a cabo otro ensayo del mismo tipo que el de la Figura 22, pero ahora incrementando la concentración de acetato a 500 mg C/L con la misma relación C/N de 1.2. Los resultados se presentan en la Figura 23.



**Figura 23.** Perfiles de consumo y producción de los componentes nitrogenados y carbonados en cultivos desnitrificantes con acetato (500 mgC/L) y nitrato, en presencia y ausencia de AQDS.

En primera instancia se ve claramente en la Figura 23A que en presencia de AQDS el acetato desapareció completamente a las 7 h, mientras que sin quinona su consumo finalizó en su total a las 15 h. Ambos ensayos (con y sin AQDS) presentaron altas eficiencias de consumo ( $E_{\text{acetato}}$  y  $E_{\text{NO}_3}$ ) cercanos al 100% y altos rendimientos de producción de carbono inorgánico ( $Y_{\text{HCO}_3}$ ) y de nitrógeno molecular ( $Y_{\text{N}_2}$ ) cercanos a 1. Sin embargo, hay que observar que el proceso desnitrificante presentó estos rendimientos después de alrededor de 11 h en los cultivos con AQDS y después de 15 h en los ensayos donde la quinona no se suplementó.

Las velocidades específicas de consumo tanto de acetato como de nitrato se presentan en la Tabla 15. Hay diferencias significativas en las velocidades de consumo de ambos compuestos con un nivel de significancia de 0.012 para el nitrato y 0.0001 para el acetato. Esto confirma el hecho de que la AQDS incrementó la velocidad del proceso de oxidación de acetato acoplado a la reducción de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{N}_2$ .

**Tabla 15.** Velocidades específicas de consumo de acetato (500 mg C/L) y de nitrato en cultivos desnitrificantes con y sin quinona (AQDS).

Ensayo	mg C-acetato/mg SSV.h	mg N- $\text{NO}_3^-$ /mg SSV.h
<b>Con AQDS</b>	$7.03 \times 10^{-2} \pm 5.21 \times 10^{-4}$	$5.90 \times 10^{-2} \pm 1.53 \times 10^{-3}$
<b>Sin AQDS</b>	$3.04 \times 10^{-2} \pm 1.41 \times 10^{-5}$	$4.87 \times 10^{-2} \pm 5.05 \times 10^{-4}$

Los perfiles de acumulación de nitritos en el medio coinciden con estas observaciones (Figura 23E). En presencia de AQDS, la formación de nitritos es mas rápida que en ausencia de la quinona, alcanzando una concentración máxima de 150 mg de  $\text{N-NO}_2^-$ /L después de las 7 h y 9 h respectivamente.

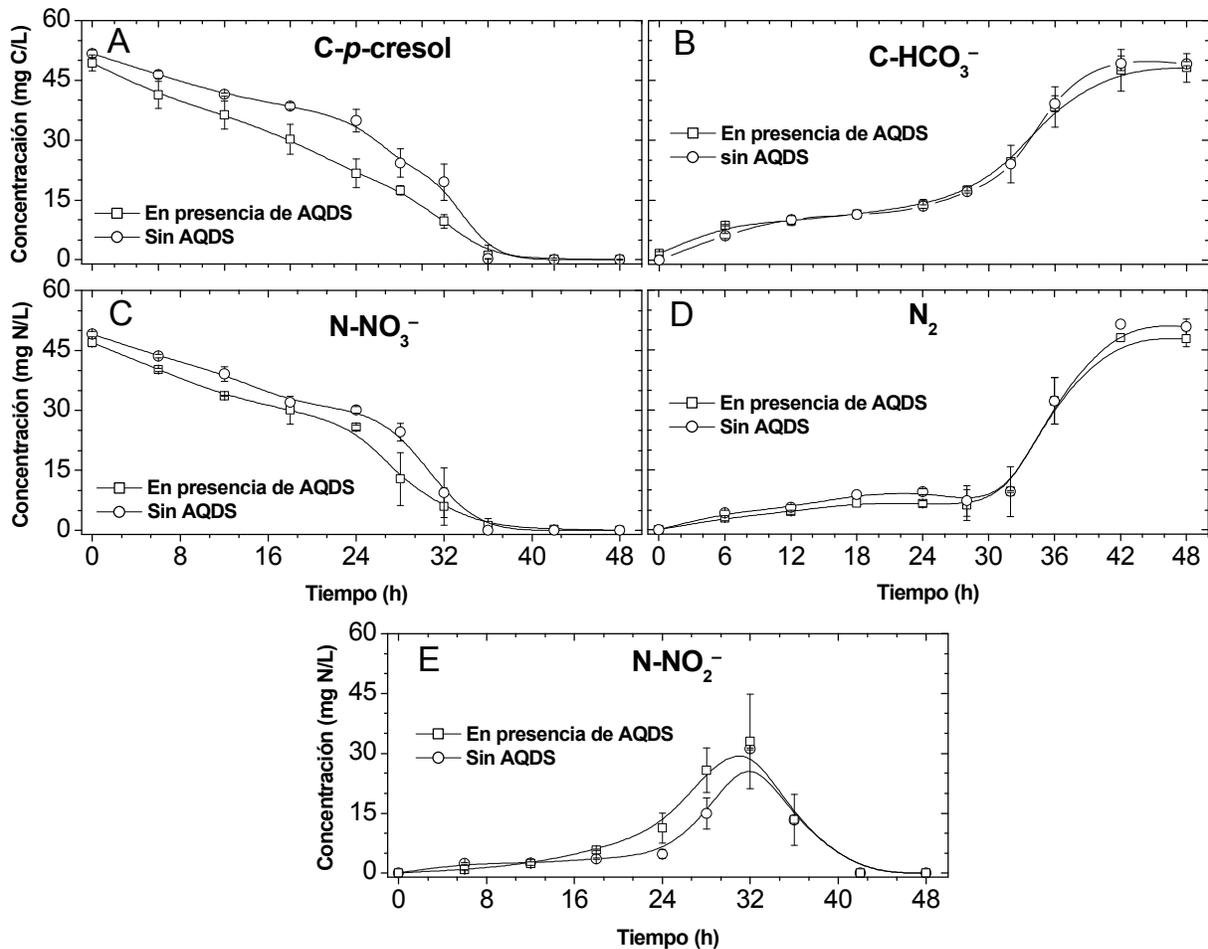
Estos resultados confirman que la presencia de la AQDS en los cultivos aumentó las velocidades del proceso desnitrificante. Aquí se presenta por primera vez evidencia de que la AQDS sirve como transportador de electrones en el proceso desnitrificante acoplado a la oxidación de materia orgánica. Sólo existen evidencias por separado de que, en su forma reducida, juega el papel de donador

de electrones en la reducción de  $\text{NO}_3^-$  a nitrógeno molecular (Lovley y *col.*, 1999a; Coates y *col.*, 2002), y en su forma oxidada como aceptor final de electrones en la oxidación de materia orgánica (Lovley y *col.*, 1996a; Field y *col.*, 2000).

Una vez que se obtuvo evidencia de la participación de la AQDS en la oxidación de un compuesto fácilmente metabolizable por un proceso desnitrificante, se procedió a probar un compuesto recalcitrante (*p*-cresol) bajo las mismas condiciones.

#### **4.2.2.2 La AQDS en la desnitrificación con un compuesto recalcitrante**

Se evaluó el efecto que tiene la quinona en la oxidación del *p*-cresol, por un lado desnitrificante, producido en estado estacionario (Figura 24). Se puede observar en la Figura 24A, que la oxidación de *p*-cresol, cuando no se suplementó AQDS, presentó una fase de retardo de 24 h, mientras que el ensayo donde se adicionó la quinona no la presentó, dándose un consumo lineal desde el inicio de la cinética hasta las 36 h. En ambos ensayos, con y sin AQDS, el *p*-cresol fue totalmente oxidado después de las 36 h. Con respecto a la formación de carbono inorgánico (Figura 24B), el comportamiento fue muy parecido en ambos casos. La quinona no tuvo un efecto en la velocidad de formación de  $\text{HCO}_3^-$ , pero si en el mecanismo de oxidación del *p*-cresol. Ya se ha señalado la formación de intermediarios a partir de la oxidación del *p*-cresol bajo condiciones desnitrificantes (Bossert y Young, 1986; Haggblom y *col.*, 1990; Spence y *col.*, 2001). La formación de intermediarios del *p*-cresol en el cultivo desnitrificante podría explicar en parte la presencia de la fase de retardo de 24 h en el ensayo sin quinona. Parece que la adición de quinona en el cultivo desnitrificante favoreció la producción de estos intermediarios, ya que no se presenta fase de retardo en la oxidación de *p*-cresol.



**Figura 24.** Perfiles de consumo y producción de compuestos nitrogenados y carbonados en cultivos desnitrificantes con *p*-cresol y nitrato en presencia y ausencia de AQDS.

La reducción de nitrato se acopla con la producción de nitrito en cada uno de los ensayos (Figura 24C y E). La producción de nitrito alcanza una concentración máxima de 32 mg N/L a las 32 h, lo que corresponde a alrededor del 80% del nitrato reducido en ese mismo tiempo. El 20% restante quedó en forma de N<sub>2</sub> (Figura 24 D). Lo interesante es observar que existe un desfase en las cinéticas de reducción de nitrato y de formación de nitrito entre los cultivos con quinona y sin ella. En presencia de AQDS, la reducción del NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a NO<sub>2</sub><sup>-</sup> es más rápida. Eso sugiere fuertemente que la adición de la quinona en el cultivo desnitrificante aumenta la velocidad de transporte de electrones de la oxidación del *p*-cresol hasta el nitrato.

Los cultivos presentaron perfiles similares de formación de N<sub>2</sub> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en ambos casos (con y sin AQDS). Una posible explicación a este fenómeno podría

ser que la quinona participa como transportador de electrones en la velocidad de reducción de nitrato a nitrito durante la oxidación del *p*-cresol a alguno de sus intermediarios, pero no en la oxidación de estos últimos a  $\text{HCO}_3^-$  y por consiguiente, tampoco en la producción máxima de nitrógeno molecular.

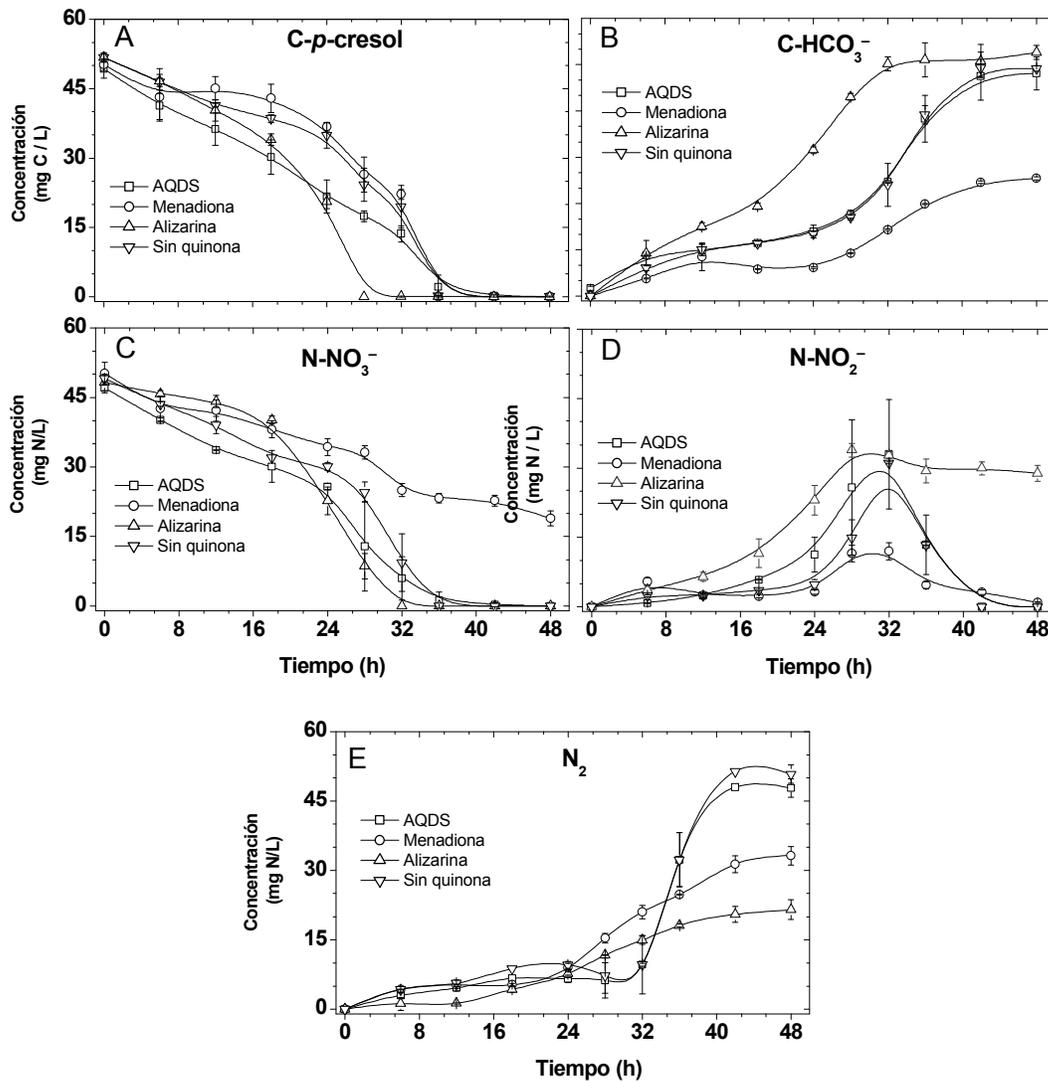
Los resultados presentados dan evidencia de que la AQDS participa como transportador de electrones en la desnitrificación con *p*-cresol, asimismo, dan un indicio de a qué nivel del metabolismo desnitrificante la AQDS está actuando, que parece ser que es en la reducción de nitrato a nitrito. Con respecto al *p*-cresol, tentativamente se podría decir que la AQDS actúa en la oxidación hacia alguno de los intermediarios, pero no en el proceso global ya que no se presentó influencia en la formación final de carbono inorgánico.

Este nivel, al que está actuando la AQDS, se podría explicar por el potencial de O/R que presenta la quinona, el cual va a dictar a qué nivel trabajará como transportador de electrones. Algunos autores remarcan que, para que las quinonas puedan utilizarse como transportadores de electrones, es necesario que tengan un potencial de O/R intermedio entre las especies en las cuales se quiere observar el proceso de óxido-reducción (Newman y Kolter, 2000; Hernández, 2001). Así funcionan algunas quinonas del metabolismo microbiano como la menaquinona y la ubiquinona (Newman y Kolter, 2000; Brock y Madigan, 1991). Constatar que este tipo de sustancias funcionan como transportadoras de electrones podría ser de mucha utilidad para el tratamiento de aguas residuales con MO recalcitrante.

#### **4.2.2.3 El efecto de otros tipos de quinonas**

Cada quinona tiene un potencial de O/R diferente y este potencial podría ser el causante del incremento en los cambios de oxidación de materia orgánica, al influenciar el metabolismo del consorcio microbiano. Hernández y Newman (2001), así como Rau y *col.* (2002), mencionan que diferentes tipos de quinonas, entre ellas la AQDS, inducen cambios metabólicos significativos y se asoció el comportamiento del cultivo con el potencial de O/R. Sin embargo, las evidencias reportadas no son muy claras, y no se entiende bien todavía cómo interviene el

potencial de O/R en el metabolismo. Para explorar más este punto de discusión, se probaron otras dos quinonas con un potencial de O/R diferente, la alizarina y la menadiona (vitamina K<sub>3</sub>) y los resultados se compararon con la AQDS. Los potenciales de O/R de cada quinona se presentan en la Tabla 16 (pag. 61). Los cultivos se llevaron a cabo con *p*-cresol (50 mg C/L) como potencial reductor y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como aceptor final de electrones. Los perfiles cinéticos obtenidos se compararon con las obtenidas con AQDS y sin quinona (Figura 25).



**Figura 25.** Estudio cinético de la oxidación del *p*-cresol bajo condiciones desnitrificantes, en presencia de diferentes tipos de quinona: AQDS (□), Menadiona (○), Alizarina (△) y sin quinona (▽).

Al probar las otras quinonas, en cultivos desnitrificantes, se puede establecer una diferencia evidente del efecto sobre el metabolismo del iodo. En la

presencia de la alizarina, el *p*-cresol desapareció completamente del medio a las 28 h, mientras que con menadiona y AQDS desapareció a las 36 h, al igual que en el ensayo control sin quinona (Figura 25A). A diferencia de la AQDS, que parece eliminar la fase de retardo en el proceso de oxidación del *p*-cresol, la alizarina acorta el tiempo de consumo por casi 8h, teniendo su correspondiente en carbono inorgánico casi al mismo tiempo (Figura 25B). Con respecto a la menadiona, se podría decir que tuvo efecto de tipo inhibitorio sobre la oxidación del *p*-cresol, ya que el consumo de *p*-cresol fue parecido al que se presenta en ausencia de quinona (Figura 25A). No se obtuvo el correspondiente en carbono de  $\text{HCO}_3^-$  (Figura 25B), ya que después de las 48 h de cultivo, sólo el 50% del carbono adicionado en forma de *p*-cresol fue oxidado a carbono inorgánico ( $Y_{\text{HCO}_3} = 0.5$ ). Presumiblemente el carbono proveniente del *p*-cresol se quedó en algún intermediario de su oxidación.

Esta diferencia en el comportamiento del lodo desnitrificante heterotrófico, en presencia de las distintas quinonas, se puede ver también en los perfiles cinéticos del consumo de nitrato (Figura 25C) y de nitrito (Figura 25D). En presencia de menadiona sólo el 62% del nitrato se consumió, con una velocidad específica de  $0.65 \times 10^{-3}$  mg N/mg SSV\*h. En este caso el rendimiento de producción de  $\text{N}_2$  fue cercano a 1. Esto indica que la menadiona inhibe la oxidación completa del *p*-cresol a  $\text{CO}_2$ , pero no inhibe la reducción de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{N}_2$ . Mientras que con la alizarina la velocidad de reducción de nitrato fue mayor con un valor de  $2.9 \times 10^{-3}$  mg N/mg SSV\*h y el tiempo necesario para eliminar la totalidad del nitrato fue menor de 32 h. Sin embargo, con alizarina, el rendimiento de producción de  $\text{N}_2$  bajó a 0.45. El nitrógeno restante se quedó en forma de nitrito.

En presencia de alizarina, la oxidación del *p*-cresol fue más rápida y completa (con un rendimiento de producción de  $\text{HCO}_3^-$  ( $Y_{\text{HCO}_3}$ ) alto), mientras que la desnitrificación se vió afectada. Estos resultados muestran que cada quinona tiene un efecto distinto sobre el metabolismo celular. En particular se pudo evidenciar que las quinonas actuaron a diferentes niveles en las rutas metabólicas de oxidación del *p*-cresol y de la desnitrificación.

En general, debe considerarse el potencial de O/R de la quinona para tratar de explicar su efecto en la degradación de materia orgánica recalcitrante (Tabla 16).

**Tabla 16.** Potenciales de óxido/reducción de las quinonas utilizadas en los ensayos de oxidación anaerobia de *p*-cresol bajo condiciones desnitrificantes (Rau y col, 2002; Hernández y Newman, 2001) (potenciales con respecto al electrodo de hidrógeno).

Quinona	E° (mV)
menadiona	-7
AQDS	-180
alizarina	-350

De acuerdo con nuestros resultados, la velocidad de oxidación del *p*-cresol es mayor con la alizarina; la AQDS favorece la oxidación del *p*-cresol a intermediarios; la menadiona no tiene efecto sobre la oxidación del compuesto fenólico, pero si afecta la producción de  $\text{HCO}_3^-$ . Con respecto a la Tabla 16 pareciera que mientras el potencial sea más negativo se incrementa la velocidad de oxidación de materia orgánica, y a menos negativo se afecta la producción de carbono inorgánico. Sucede lo contrario con el proceso de desnitrificación ya que a potenciales menos negativos no se afecta la producción de nitrógeno atmosférico, mientras que a más negativos baja el rendimiento desnitrificante favoreciendo la producción de nitrito.

Estos resultados no concuerdan con la literatura, ya que generalmente se señala que a potenciales más positivos, se favorecen procesos de oxidación y viceversa. Hay que considerar que los potenciales de las quinonas pueden cambiar una vez mezcladas en el medio desnitrificante. Generalmente el valor del potencial de la quinona en el medio de trabajo es relativamente diferente al reportado en la literatura. Además, seguramente el potencial de O/R no es el único factor que dirige estos procesos. Restaría más trabajo experimental para entender mejor como intervienen las quinonas en los procesos microbianos.

---

## **Capítulo 5**

# **CONCLUSIONES**

## 5. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se estudió el efecto que presentaba la AQDS en la oxidación de materia orgánica, bajo condiciones desnitrificantes con un lodo estable fisiológicamente, proveniente de un reactor en continuo desnitrificante en estado estacionario.

Las principales conclusiones son:

En condiciones de heterotrofia en el reactor continuo de tanque agitado, con una velocidad de carga de  $\text{N-NO}_3^-$  de  $418 \pm 7.8$  mg/L d, C/N 1.3, el consumo de los substratos nitrogenados y carbonados alcanzaron eficiencias de  $100 \pm 2$  % y  $99.3 \pm 2.9\%$  respectivamente, con un rendimiento desnitrificante ( $Y\text{-N}_2$ ) de  $1 \pm 0.02$  en el estado estacionario.

El lodo proveniente del reactor continuo desnitrificante en estado estacionario fue capaz de reducir a la AQDS mediante la oxidación de materia orgánica (acetato y *p*-cresol) en ausencia de nitrato. Se obtuvieron rendimientos de producción de  $\text{CO}_2$  y eficiencias de consumo altos, cumpliéndose las estequiometrías con ambas fuentes carbonadas, al final de los ensayos. La velocidad de oxidación fue significativamente menor con AQDS, que con el nitrato.

La presencia de AQDS, en el proceso desnitrificante con acetato (500 mg C/L) incrementó la velocidad de oxidación de materia orgánica, disminuyendo un 50% el tiempo de oxidación. Con *p*-cresol (50 mg C / L) disminuye la fase de retardo, más no el tiempo total del proceso de oxidación. En ambos casos (acetato y *p*-cresol), los rendimientos de producción en  $\text{CO}_2$  y  $\text{N}_2$  fueron cercanos a 1. La AQDS parece favorecer cinéticamente la oxidación del *p*-cresol a intermediarios y la reducción de nitrato a nitrito.

La evidencia obtenida muestra que la AQDS participa como transportador de electrones durante el proceso desnitrificante, ya sea cuando se usa acetato como *p*-cresol, obteniendo respuestas fisiológicas diferentes en ambos casos. Los resultados muestran que la presencia de AQDS, en cultivos desnitrificantes heterotróficos, puede incrementar la velocidad de oxidación de la materia orgánica.

La AQDS funciona como aceptor final de electrones cuando se encuentra sola y como transportador cuando está en presencia de nitrato, en la oxidación de materia orgánica. El nitrito, a pesar de ser una sustancia muy reactiva, no reacciona con la AQDS reducida y no provoca interferencia en el proceso.

Diferentes quinonas, caracterizadas por un potencial de óxido-reducción, provocaron un efecto metabólico significativamente diferente sobre la oxidación de la MO como sobre la reducción de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{N}_2$ . La respuesta fisiológica del lodo desnitrificante en presencia de diferentes quinonas parece estar relacionada con las diferencias en los valores de los potenciales de O/R.

---

## **BIBLIOGRAFIA**

## 6. REFERENCIAS

**Acton D.W. y Barker J. F.** (1992). *In situ* biodegradation potential of aromatic hydrocarbons in anaerobic groundwaters. *J Contam Hydrol* 9:325-52

**Benz M., Schink B., y Brune A.** (1998) Humic acid reduction by *Propionibacterium freudenreichii* and other fermenting bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:4507-4512.

**Bossert D. I. y Young Y.,** (1986). Anaerobic Oxidation of p-Cresol by Denitrifying Bacterium, *Applied and Environmental Microbiology*. 52(5):1117–1122

**Bouwer J. E. y McCarty L. P.,** (1983) Transformations of Halogenated Organic Compounds Under Denitrification Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 45(4): 1295-1299.

**Bradley M, P., Chapelle H. F., y Lovley R. D.** (1998). Humic Acids as Electron Acceptors for Anaerobic Microbial Oxidation of Vinyl Chloride and Dichloroethene, *Applied and Environmental Microbiology*. 64(8):3102–3105

**Brock, T. y M. Madigan.** (1991). Microbiología. 8a. ed. Prentice Hall Hispanoamérica. México. pp.109

**Carr, G. y S. Ferguson.** (1990). The nitric oxide reductase of *Paracoccus denitrificans*. *Biochem. J.* 269:423-429.

**Cervantes, F., O. Monroy, J. Gómez.** (1998). Accumulation of intermediates in a denitrifying process at different copper and high nitrate concentrations. *Biotechnol. Lett.* 20:959-961.

**Cervantes C. F., Pérez J, Gómez J.** (2000a). Avances en la Eliminación Biológica de Nitrógeno de las Aguas Residuales, *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42(2): 73-82.

**Cervantes J. F., Van der Velde S., Lettinga G. y Field J, A.** (2000b). Quinones as Terminal Electron Acceptors for Anaerobic Microbial Oxidation of Phenolic Compounds. *Biodegradation*. 11:313-321.

**Cervantes FJ, van der Velde S, Lettinga G, Field JA** (2000c) Competition between methanogenesis and quinone respiration for ecologically important substrates in anaerobic consortia. *FEMS Microbiol. Ecol.* 34:161-171.

**Cervantes J. F., Dijkma W., Duong-Dac T., Ivanova A., Lettinga G. y Field J, A.** (2001), Anaerobic Mineralization of Toluene by Enriched Sediments with Quinones and Humus as Terminal Electron Acceptors, *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10): 4471-4478.

**Cervantes J. F.**, (2002), Quinones as Electron Acceptors and Redox Mediators for the Anaerobic Biotransformation of Priority Pollutants. Tesis, Doctorado en Ciencias Ambientales, Wageningen University, Países Bajos.

**Chayabutra C. y Ju L.** (2000). Degradation of *n*-Hexadecane and Its Metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* under Microaerobic and Anaerobic Denitrifying Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(2):493–498

**Challis, B. C. y Challis, L. A.** (1982). N-Nitrosamines and N-nitrosoimines. En: *The Chemistry of Amino, Nitroso and Nitro-compounds and their Derivatives*, Ed. S. Patai, Wiley, New York, pp. 1151.

**Cheremisinof T. P.** (1996). *Biotechnology for Waste and Waste Water Treatment*, Noyes Publications, pp. 25-27.

**CNA. (Comisión Nacional del Agua).** (2004a). Usos del Agua e Infraestructura, En: *Estadísticas del Agua en México*. 2 ed. pp 40-66, México.

**CNA. (Comisión Nacional del Agua).** (2004b). Situación de los recursos hidráulicos, en: *Estadísticas del Agua en México*, 2 ed. pp 28-32, México.

**Coates, J. D., D. J. Ellis, E. Roden, K. Gaw, E. L. Blunt-Harris, y D. R. Lovley.** (1998). Recovery of humic-reducing bacteria from a diversity of environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1504–1509.

**Coates J. D., Cole A. K., Chakraborty R, O'Connor S. M., Achenbach L. A.** (2002), Diversity and Ubiquity of Bacteria Capable of Utilizing Humic Substances as Electron Donors for Anaerobic Respiration, *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5): 2445–2452

**Cole, J. y C. Brown.** (1980). Nitrite reduction to ammonia by fermentative bacteria: a short circuit in the biological nitrogen cycle. *FEMS Microbiol. Lett.* 7:65-72.

**Cole, J. A.** (1988). Assimilatory and dissimilatory reduction of nitrate to ammonia. En: *The Nitrogen and Sulphur Cycles*. Eds J. Cole and S. Ferguson, Cambridge University Press, pp.281-330.

**Coyle, C. L., W. G. Zumft, P. M. H. Kroneck, H. Körner and W. Jakob.** (1985). Nitrous oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas perfectomarina* – Purification and properties of a novel multicopper enzyme. *Eur. J. Biochem.* 153:459- 467.

**Cozzarelli I. M, Herman, JS, and Baedecker, MJ** (1995). Fate of microbial metabolites of hydrocarbons in a coastal plain aquifer: the role of electron acceptors. *Environ Sci Technol* 29:458-469.

**Cuervo L. F. de M.**, (2003) Estudio Biológico-Físicoquímico de un Lodo Desnitrificante Alimentado con Diferentes Fuentes de Electrones. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa, México.

**Douglass, M. L., Kabacoff, B. L., Anderson, G. A. and Cheng, M. C.** (1978). The chemistry of nitrosamine formation, inhibition and destruction. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 29:581-606.

**Evans PJ, DT Mang, y LY Young.** (1991). Degradation of toluene and m-xylene and transformation of o-xylene by denitrifying enrichment cultures. *Appl Environ Microbiol* 57: 450-454

**Ferguson, J. S.** (1994). Denitrification and its control. *Antonie van Leeuwenhoek* 66:89-110.

**Ferguson J. S.** (1998). Nitrogen cycle enzymology, *Current Opinion in Chemical Biology* 1998, 2:182–193.

**Field J. A., Cervantes C. F., Van Der Zee S, Lettinga G.** (2000) Role of Quinones in Biodegradation of priority pollutants: a Review, *Water Sci. Technol.* 42(5-6):215-222.

**Frimmel H. F., Christman F. R.** (1988). Humic Substances and Their Role in the Environment, Dahlem Workshop Reports; *Life Sciences Research Reports* 41. pp 179-192.

**Fu M. H. y Alexander M.** (1996) Biodegradation of styrene in waterlogged soils and aquifer solids. *Soil Science.* 161: 846-851.

**Fukui M., Harms G., Rabus R., Schramm A, Widdel F., Zengler K., Boreham K., Wilkes H.**, (2000). Anaerobic degradation of oil hydrocarbons by sulfate-reducing and nitrate-reducing bacteria. *Microbial Ecology of Oil Fields.* 41:1-9

**Gaudy F. A. Jr., Gaudy T. E.** (1981). Microbiology for Environmental Scientists and Engineers, *Mc-Graw Hill International.*

**Godden, J., S. Turley, D. Teller, E. Adman, M. Liu, W. Payne and J. Legall.** (1991). The 2.3 angstrom X-ray structure of nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes*. *Science* 253:438-442.

**Goretski, J. y Hollocher T.C.** (1990). The kinetic and isotopic competence of nitric oxide as an intermediate in denitrification. *J. Biol. Chem.* 265:889-895.

**Hagblom M. M., Rivera D. M, Bossert I. D., Young Y,** (1990) Anaerobic biodegradation of *Para*-cresol under three reducing conditions. *Microbial Ecology,* 20:141-150.

**Halling-Sorensen B. y Hjuler. H.** (1992). Simultaneous nitrification and denitrification with an upflow fixed bed reactor applying clinoptilolite as media., *Water Treatment*, 7:77-88.

**Hartman, P . E.** (1983). Nitrate/nitrite ingestion and gastric cancer mortality. *Environ. Mutagen.* 5 , 11:1-121.

**Hernandez M. E. y Newman D. K.,** (2001). Extracellular electron transfer, *Cellular and Molecular Life Sciences.* 58: 1562-1571.

**Hollinger C, Stams A. J. M., and Zehnder A. J. B.** (1988). Anaerobic degradation of recalcitrant compounds. En: Hall, E. R. y Hobson (Eds) *Anaerobic Digestion*, Quinto Simposio internacional de Digestión anaerobia (pp 211–224). Bologna, Italia.

**Hong Z., Hanaki K. y Matsuo T.** (1994). Greenhouse gas-N<sub>2</sub>O production during denitrification in wastewater treatment. *Water Science Technology*, 28:203-207.

**Hutchins S. R.** (1991). Optimizing BTEX Biodegradation Under Denitrifying Conditions. *Environmental Toxicology Chemistry.* 10:1437-1448.

**Jetten, M., S. Logemann, G. Muyzer, L. Robertson, S. de Vries, M. van Loosdrecht y J. Kuenen.** (1997). Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *Antonie van Leeuwenhoek.* 71:75-93.

**Kissinger T. P. y Heineman R. W.** (1983). Cyclic Voltammometry. *Journal of Chemical Education*, 9(60):702-706.

**Knowles, R.** (1982). Denitrification. *Microbiology. Rev.*46:43-70.

**Kroneck, P. M. M., J. Beuerle y R. W. Schumacher.** (1992). Metal-dependent conversion of inorganic nitrogen and sulfur compounds, En: H. Siegel and A. Siegel (ed.). *Metal ions in biological systems*, 28. *Marcel Dekker*, U.S.A. pp. 455-505.

**Letterman D. R.** (1999). *Water Quality and Treatment. A Handbook of Community Water Supplies. Mc-Graw Hill (pp 211–224).*

**Lesage S., Chi Li W., Millar Kelly, Brown S., Liu D.,** (1998). Effect of humic acids on the bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons from aquifers contaminated with petroleum in proceedings, 6th Symposium and Exhibition on Groundwater and Soil Remediation, p. 325-338

**Lewandowski, Z.** (1985), Denitrification by Packed Bed Reactors in the Presence of Chromium (VI) - Resistance to Inhibition, *Water Research.*, 19:589-596.

- Lovley R. D., Coates J. D., Blunt-Harris L. E., Phillips E. J. P. y Woodward J.** (1996a). Humics Substances as Electron Acceptors for Microbial Respiration, *Nature* 382:445-448.
- Lovley R. D., Woodward J., Chapelle H. F.** (1996b). Rapid Anaerobic Benzene Oxidation with a Variety of Chelated Fe(III) Forms, *Applied and Environmental Microbiology*. 62(1):288-291.
- Lovley, D. R., J. L. Fraga, E. L. Blunt-Harris, L. A. Hayes, E. J. P. Phillips, y J. D. Coates.** (1998). Humic substances as a mediator for microbially catalyzed metal reduction. *Acta Hydrochimical Hydrobiologia*. 26:152–157.
- Lovley R. D., Fraga L. J., Coates J. D. y Blunt-Harris L. E.** (1999a). Humics as an Electron Donor for Anaerobic Respiration, *Environmental Microbiology* 1(1):89-98
- Lovley R. D. y Blunt-Harris,** (1999b). Role of Humic-Bound Iron as an Electron Transfer Agent in Dissimilatory Fe(III) Reduction, *Applied and Environmental Microbiology*. 65(9):4252-4254.
- Lyngkilde J. y Christensen T. H.** (1992). Fate of organic contaminants in the redox zones of a landfill leachate pollution plume (Vejen, Denmark). *J Contam Hydrol* 10: 291-307.
- Mabbot A. G..** (1983). An introduction to Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education*. 60(9):697-702.
- MacCarthy P., Clapp E. C., Malcolm L. R., Bloom R. P.** (1990). Humic Substances in Soils and Crop Sciences: Selected Readings. *American Society of Agronomy. Inc., Soil Science Society of America, Inc.* pp 1-11.
- Mateju V., Cizinska S., Krejeí J., y Janoch T.** (1992). Biological Water Denitrification – A Review, *Enzyme Microb. Technol.*, 14:170-183.
- Mohelcic R. J. y Luthy G. R.,** (1988). Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Compounds under Various Redox Conditions in Soil-Water Systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 54(5):1182-1187
- Monteith HD, Bridle TR, Sutton PM** (1980) Industrial waste carbon sources for biological denitrification. *Prog. Water Tech.* 12:127– 141
- Mormille M. R. Liu, Shi, y Suflita, JM.** (1994) Anaerobic biodegradation of gasoline oxygenated: extrapolation of information to multiple sites and redox conditions. *Environ Sci Technol* 28: 1727-1732.
- Newman K. D. y Kolter R.,** (2000). A Role for Excreted Quinones in Extra cellular Electron Transfer. *Nature*, 405:94-97.

**Oakes D.** (1996). Nitrate in Water, En: Hill Michael (Eds), Nitrates and Nitrites in Food and Water. *Woodhead Publishing Limited* (pp 33-58). UK

**Oh J. y Silversten J.** (1999). Acetate Limitation and Nitrite Accumulation During Denitrification. *Journal of Environmental Engineering*. 234-242.

**Pérez T. J.,** (1998), Estudio del efecto del pH y la fuente de electrones en la desnitrificación en estado estacionario. Tesis, Maestría en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa, México.

**Rabus R. y Widdel F.** (1996). Utilization of alkylbenzenes during anaerobic growth of pure cultures of denitrifying bacteria on crude oil. *Appl Environ Microbiol* 62:1238-1241

**Rabus R, Wilkes H, Schramm A, Harms G, Behrends A, Amann R, Widdel F.,** (1999) Anaerobic utilization of alkylbenzenes and *n*-alkanes from crude oil in an enrichment culture of denitrifying bacteria affiliating with the  $\beta$ -subclass of *Proteobacteria*. *Environ Microbiol*, Vol. 1 Issue 2 Page 145 April 1999

**Ramanand, K y Suflita, J. M.,** (1991) Anaerobic degradation of *m*-cresol in anoxic aquifer slurries: Carboxylation reactions in a sulfate-reducing bacterial enrichment. *Applied Environmental Microbiology*, 57(6): 1689-1695

**Rau J., Knackmuss Hans-Joachim, Stolz Andreas.** (2002), Effects of different quinoid redox mediators on the anaerobic reduction of Azo Dyes by bacteria. *Environmental Science Technology*. 36:1497-1504.

**Richardson D. J. y Watmough N. J.** (1999), Inorganic nitrogen metabolism in bacteria, *Current Opinion in Chemical Biology*, 3:207–219

**Richardson D. J., Wehrfritz J. M. , Keech A., Crossman L. C., Roldan M. D., Sears H. J., Butler, C. S., Reilly A., Moir J. W., Berks B.C.** (1998). The diversity of redox proteins involved in bacterial heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Biochem Soc Trans*. 26:401-408.

**Rockne J. K. y Strand S. E.** (1998). Biodegradation of Bicyclic and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Anaerobic Enrichments. *Environ. Sci. Technol*. 32:3962-3967

**Ronen Z. y Bollag J. M.** (1992) Rapid anaerobic mineralization of pyridine in a subsurface sediment inoculated with a pyridine-degrading *Alcaligenes* sp. *Appl Microbiol Biotechnol* 37: 264-269.

**Sacks L. E. y Barker A. H.** (1952). Substrate Oxidation and Nitrous Oxide Utilization in Denitrification. *Journal of Bacteriology* ,64:247-252

**Scott D., Mcknigh D., Lovley R. D., Kolesar S. y Blunt-Harris L. E.** (1998). Quinone Moieties, as Electron Acceptor in the Reduction of Humic Substances by Humic-Reducing Microorganisms. *Environ. Sci. Technol.* 32:2984-2989.

**Seibel F., S. Heidenreich y Frimmel F. H.,** (1996). Interaction of humic substances and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) during the biodegradation of PAHs. *Acta Hydrochim. Hydrobiol* 24:260-266.

**Semprini L, Hopkins GD, Mccarty PL..** (1992) In-situ transformation of carbon tetrachloride and other halogenated compounds resulting from biostimulation under anoxic conditions. *Environ Sci Technol* 26: 2454-2461

**SEMARNAT** (2002a). Agua, En: Informe de la Situación del Medio ambiente México, Compendio de Estadísticas ambientales. pp 129- 154.

**SEMARNAT** (2002b). Normatividad, En: Informe de la Situación del Medio Ambiente México, Compendio de Estadísticas ambientales. Apéndices.

**Shuker, D. E. G.** (1988). The chemistry of N-nitrosation. In: *Nitrosamines: Toxicology and Microbiology*. Ed. M. J . Hill, Ellis Horwood, Chichester, p. 48.

**Smith K. A. y Arah J. R. M.,** (1986). Anaerobic microenvironments in Soils and the Occurrence of anaerobic bacteria. *FEMS Simposium 33*, pp 1986, *Elsevier*.

**Sorensen H. B. y Jorgensen S.E.** (1993). The removal of nitrogen compounds from wastewater, *Studies in Environmental Science 54 . Elsevier.*, pp 119-152.

**Spence M. J., S. H. Bottrell, Higgo J. J. W., Harrison I., Fallick A. E.** (2001). Denitrification and phenol degradation in a contaminates aquifer *Journal of Contaminant Hydrology*, 53:119-152.

**Stouthamer, A.** (1976). Biochemistry and genetics of nitrate reductase in bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.* 14:315-375.

**Thauer, R. K, Jungermann, K. y Decker, K.** (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriology Reviews*, 41:100-180

**Tiedje, J. M.** (1988). Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium, En: A. J. B. Zehnder (ed.). *Biology of anaerobic microorganisms*. *Wiley-Liss*, New York. pp. 179-218

**Tschech, A y Fuchs, G.** (1987). Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying pseudomonads. *Arch Microbiol* 148: 213-217

**Van Benschoten J. J., Lewis Y. J., Heineman R. W., Roston A. D., Kissinger T. P.** (1983). Cyclic Voltammetry Experiment. *Journal of Chemical Education*. 9(60):772-776.

**Van de Graff, A., A. Mulder, P. Bruijn, M. Jetten, L. Robertson and J.G. Kuenen.** (1995). Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1246-1251.

**Van de Graff A. A., P. de Bruijn, L. A. Robertson, M. S. M. Jetten and J. Kuenen.** (1996). Autotrophic growth of anaerobic, ammonium-oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology.* 142:2187-2196.

**Van de Graff, A., P. de Bruijn, L. Robertson, M. Jetten y J. Kuenen.** (1997), Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of <sup>15</sup>N studies in a fluidized bed reactor. *Microbiology.* 143:2415-2421.

**Vargas B. C., Song B., Camps M. M., Haggblom M.,** (2000), Anaerobic degradation of fluorinated aromatic compounds. *Appl Microbiol Biotechnol.* 53: 342-347

**Wilson JT , McNabb JF, Cochran JW, Wang TH, Tomson MB y Bedient PB,** (1985). Influence of microbial adaptation on the fate of organic pollutants in ground water. *Environ Toxicol Chem* 4:721-726

**Zumft W. G.** (1997). Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* , 61(4):533–616.

Iztapalapa, D.F. a 16 de Diciembre del 2004

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**EFFECTO DE LAS QUINONAS EN LA OXIDACION ANAEROBIA DE MATERIA ORGANICA RECALCITRANTE POR UN LODO DESNITRIFICANTE**

Que presentó

**Arturo Cadena Ramírez**

**Comité Tutorial**

Director: Dr. Jorge Gómez Hernández

Asesores: Dra. Anne Claire Texier

Dr. Francisco Cervantes Carrillo



Texier

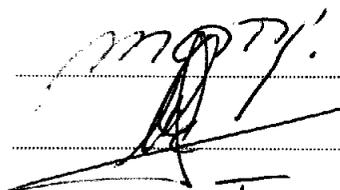
**Jurado**

Presidente: Dra. Mónica Meraz Rodríguez

Secretario: Dr. Ernesto Favela Torres

Vocal: Dra. Anne-Claire Texier

Vocal: . Dr. Ignacio Gonzáles Martínez



Texier

