



**Casa abierta al tiempo**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
IZTAPALAPA**

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

---

---

**“ESTUDIO FISIOLÓGICO DE LA OXIDACIÓN DEL 2-  
CLOROFENOL POR UN LODO DESNITRIFICANTE”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA**

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

**EMIR MARTÍNEZ GUTIÉRREZ**

**DIRECTOR**

**DR. JORGE GÓMEZ HERNÁNDEZ**

**Febrero 2013**

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del **CONACYT**, con la referencia 001466.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología Microbiana del Departamento de Biotecnología de la UAM – Iztapalapa con apoyo del **CONACYT** a través del convenio CB-2005-C01-49748-Z.

El proceso de conclusión de la idónea comunicación de resultados se llevó a cabo gracias al apoyo otorgado por la **UAM** y el **ICyTDF**.

México D.F. a 22 de Febrero del 2013

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

**Estudio fisiológico de la oxidación del 2-clorofenol por un  
lodo desnitrificante**

que presentó

**Emir Martínez Gutiérrez**

Comité Tutorial:

Director: Dr. Jorge Gómez Hernández

Asesor: Dra. Flor de María Cuervo López

Asesor: Dr. Humberto González Márquez

Jurado:

Presidente: Dra. Flor de María Cuervo López

Secretario: Dr. Ricardo Beristan Cardoso

Vocal: Dr. Sergio Martínez Hernández

Vocal: Dr. Iván Moreno Andrade



México D.F. a 22 de Febrero del 2013

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

**Estudio fisiológico de la oxidación del 2-clorofenol por un  
lodo desnitrificante**

que presentó

**Emir Martínez Gutiérrez**

Comité Tutorial:

Director: Dr. Jorge Gómez Hernández

Asesor: Dra. Flor de María Cuervo López

Asesor: Dr. Humberto González Márquez

Jurado:

Presidente: Dra. Flor de María Cuervo López

\_\_\_\_\_

Secretario: Dr. Ricardo Beristain Cardoso

\_\_\_\_\_

Vocal: Dr. Sergio Martínez Hernández

\_\_\_\_\_

Vocal: Dr. Iván Moreno Andrade

\_\_\_\_\_

*Con amor para Delfino, Angélica y Eduardo, por llenar mi vida de experiencias gratas y por ser mi razón de ser.*

*A mis padres, hermanos, suegros, cuñados y sobrinos por el amor y apoyo que me han brindado.*

*A Dios por ser mi luz en momentos de oscuridad.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Dr. Jorge Gómez por la dirección de esta tesis, así como su invaluable apoyo, consejos y tiempo invertido en mi formación. Gracias por las largas jornadas de discusión y análisis, las cuales han contribuido en mi desarrollo.

A la Dra. Flor de María Cuervo y al Dr. Humberto González por su asesoría, consejos y comentarios pertinentes en el desarrollo de este trabajo. Sin su valioso apoyo no hubiera sido posible llegar a este momento, gracias.

Al jurado por la revisión de este trabajo, por los comentarios realizados y el tiempo invertido.

A la Dra. Anne-Claire Texier por las tardes de discusión, por su apoyo y amistad.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Citlalli, Gehovana, Karina, Jacqueline, Antonio, Diego, Emmanuel, Felipe, Miguel, Miguel A., Oscar, Ricardo y Sergio. Gracias por el buen ambiente de trabajo, por los buenos momentos de discusión compartidos, y sobre todo por su amistad.

*“Lo que sabemos es una gota de agua,  
lo que ignoramos es todo el océano”*  
**Isaac Newton**

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>I</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Tratamiento biológico de aguas residuales</b>	<b>5</b>
<b>1.2 Eliminación biológica de nitrógeno</b>	<b>6</b>
1.2.1 Ciclo del Nitrógeno	7
<b>1.3 Nitrificación</b>	<b>9</b>
<b>1.4 Desnitrificación</b>	<b>11</b>
1.4.1 Microbiología de la desnitrificación	12
1.4.2 Bioquímica de la desnitrificación	15
1.4.3 Fisiología de la desnitrificación	21
<b>1.5 Clorofenoles</b>	<b>31</b>
1.5.1 Propiedades fisicoquímicas de los clorofenoles	32
1.5.2. Efectos biológicos de los clorofenoles (Toxicidad de los clorofenoles)	32
1.5.3 Eliminación fisicoquímica de los clorofenoles	34
1.5.4 Eliminación biológica de los clorofenoles	35
1.5.5 Estrategias para incrementar el consumo del 2-CF	45
<b>1.6 Bibliografía</b>	<b>48</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>72</b>



<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>74</b>
3.1 Objetivo general	74
3.2 Objetivos particulares	74
<b>4. METODOLOGÍA</b>	<b>76</b>
4.1 Diseño y operación del reactor UASB	76
4.2 Fuente de inóculo	79
4.3 Ensayos en lote	79
<b>4.4 Métodos analíticos.</b>	<b>80</b>
4.4.1 Cuantificación de 2-clorofenol, fenol y otros compuestos aromáticos	81
4.4.2 Carbono	81
4.4.3 Acetato y propionato	82
4.4.4 Cuantificación de glucosa	83
4.4.5 Cuantificación de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y nitrito ( $\text{NO}_2^-$ )	83
4.4.5. Nitrógeno, dióxido de carbono, metano y óxido nitroso	85
4.4.6. Sólidos suspendidos	86
<b>4.5 Bibliografía</b>	<b>87</b>
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>89</b>
<b>5.1 Efecto de la adición de acetato y fenol sobre el consumo del 2-clorofenol por un lodo desnitrificante.</b>	<b>89</b>
5.1.2 Resumen	89

5.1.2	Introducción	90
5.1.3	Materiales y Métodos	92
5.1.4	Resultados y discusión	95
5.1.5	Conclusiones	108
5.1.6	Bibliografía	108
<b>5.2 Eliminación del 2-clorofenol en presencia de diferentes donadores de electrones utilizando un lodo estabilizado sin previa exposición a compuestos fenólicos.</b>		<b>113</b>
5.2.1	Resumen	113
5.2.2	Introducción	113
5.2.3	Material y métodos	115
5.2.3	Resultados y discusión	117
5.2.4	Conclusiones	126
5.2.5	Bibliografía	127
<b>5.3 Comportamiento respiratorio de un lodo desnitrificante en presencia y ausencia del 2-CF.</b>		<b>131</b>
5.3.1	Resumen	131
5.3.2	Introducción	132
5.3.3	Materiales y métodos	133
5.3.3	Resultados y discusión	136
5.3.4	Conclusiones	146
5.3.5	Bibliografía	146
<b>6. CONCLUSIONES GENERALES</b>		<b>150</b>
<b>7. RECOMENDACIONES</b>		<b>152</b>

## RESUMEN

El consumo biológico de los clorofenoles, compuestos generados por diversas industrias como la del papel, tintes, pesticidas y herbicidas, es generalmente difícil. Existen datos que muestran que por medio de la metanogénesis se pueden eliminar de las aguas residuales. Hay algunos indicios que por medio de la desnitrificación es también posible su eliminación. En cualquier caso, los estudios realizados sólo aportan algunos datos sobre la eficiencia de consumo, pero es poca la información sobre el destino de los clorofenoles y no se cuenta con información suficiente que muestre cuales son los pasos limitantes. En el presente trabajo se aportan nuevas evidencias experimentales que contribuyen a una mejor comprensión de la eliminación del 2-clorofenol (2-CF) en cultivos en lote, utilizando un lodo desnitrificante fisiológicamente estable. El trabajo constó de tres etapas. En la primera se estudió la eliminación del 2-clorofenol (22 mg C/L) en condiciones desnitrificantes iniciales con la presencia de fenol (69 y 92 mg C-fenol/L) o acetato (60 y 108 mg C-acetato/L) como cosustratos. Cuando el fenol fue adicionado, la velocidad específica de consumo del 2-CF se incrementó hasta 2.6 veces con respecto al control sin cosustratos, mientras que con acetato el incremento fue hasta 9 veces con eficiencias hasta de 100%. El lodo desnitrificante mineralizó simultáneamente el 2-CF, fenol o acetato y redujo el nitrato a  $N_2$ . No obstante, con los resultados obtenidos, no se pudo establecer que el consumo de nitrato estuviera ligado al consumo del 2-CF. En la segunda etapa, se evaluó la eliminación de 2-CF en condiciones anaerobias en ausencia de nitrato y en presencia de diferentes donadores de electrones (fenol, acetato o glucosa) a diferentes concentraciones (77, 127 y 177 mg C/L), para determinar el efecto del tipo y la concentración del donador de electrones sobre el consumo del 2-CF. Los tres donadores de electrones incrementaron la eficiencia de consumo del 2-CF, en comparación con el control sin donador de electrones, con valores de hasta 53.3%, 97,8% y 98.6% en presencia de fenol, glucosa y acetato, respectivamente. Con glucosa y acetato la velocidad de consumo de 2-CF se incrementó, con respecto al control, hasta 3 y 8.4 veces, respectivamente. Los resultados sugirieron

que el tipo de donador de electrones, más que su concentración, determinaron los valores de la eficiencia y velocidades específicas y no dependieron de su similitud con el 2-CF. En la tercera etapa se estudió el efecto de la presencia del 2-CF en el proceso desnitrificante, usando fenol, acetato o glucosa como donadores de electrones. En presencia de 2-CF, la eficiencia de consumo de nitrato ( $E_{NO_3^-}$ ) disminuyó cuando la glucosa o el fenol fueron la fuente de electrones, mientras que con acetato no se observó un efecto. La velocidad específica de consumo de nitrato ( $q_{NO_3^-}$ ) disminuyó en presencia de 2-CF cuando la glucosa o el fenol fueron los donadores de electrones, mientras que la  $q_{NO_3^-}$  se incrementó 1.36 veces en los ensayos con acetato. Así, el efecto del 2-CF sobre el cultivo fue diferente dependiendo del donador de electrones utilizado.

Los resultados obtenidos en este trabajo indicaron que el cosustrato tuvo un papel muy importante en la mineralización 2-CF, ya que la velocidad de consumo de 2-CF aumentó significativamente. Los resultados mostraron que el paso limitante fue la descloración y se verificó que el fenol es un intermediario de la oxidación de 2-CF. Estas evidencias pueden ser muy útiles en el tratamiento de aguas residuales que contengan 2-CF.

## ABSTRACT

Biological consumption of chlorophenols, compounds generated by various industries such as paper, dyes, pesticides and herbicides, is generally difficult. There are some evidences which indicate that these compounds can be removed from water by methanogenesis or denitrification. In any case, these studies only provide some signs on consumption efficiency, but information about the fate of chlorophenols or the limiting step in the processes is even scarce. The present work provides new experimental evidences which contribute for a better understanding of 2-chlorophenol (2-CP) removal from water. The work consisted of three stages. In all cases denitrifying sludge produced in steady state with no previous exposition to 2-CP was used in batch cultures. At first, it was evaluated the removal of 2-chlorophenol in presence of nitrate, phenol (69 and 92 C-phenol mg/L) or acetate (60 and 108 C-acetate mg/L) as cosubstrate. Specific consumption rate of 2-CP increased in 2.6 and 9 times when phenol or acetate were respectively added, when compared to the control without cosubstrates. Likewise, efficiencies up to 100% were achieved. Denitrifying sludge simultaneously mineralized 2-CP, phenol or acetate whereas nitrate was reduced to  $N_2$ . In spite of the improvements in 2-CP removal it was not possible to establish if nitrate depletion was linked to the 2-CP removal. In a second stage, it was evaluated in absence of nitrate the effect of different concentrations (77, 127 and 177 mg C/L) of phenol, glucose or acetate on the removal of the 2-chlorophenol (22 mg C/L) under anaerobic conditions. Consumption efficiency of 2-CP increased up to 53.3 %, 97.8% and 98.6% for phenol, glucose and acetate, respectively. Specific consumption rate of 2-CP increased up to 3 and 8.4 times in the assays with glucose and acetate, respectively, as compared to the control without donor electron. The results suggested that electron donor type, rather than its concentration determined the 2-CP consumption efficiencies and specific rates values. These effects were not linked to its structural similarity with the 2-CP. On the third stage it was studied the effect of the presence of 2-CP (22 mg C/L) on the denitrifying process, using phenol, acetate o glucose as electron source. In presence of 2-CP, nitrate consumption efficiency ( $E_{NO_3^-}$ ) decrease when glucose or phenol were the electron source, whereas no

effect in this parameter was observed with acetate. The nitrate consumption specific rate ( $q_{\text{NO}_3^-}$ ) decreased in the presence of 2-CP when phenol or glucose were the electron donors whereas the  $q_{\text{NO}_3^-}$  increased 1.36 in the assays amended with acetate. Thus, the effect of 2-CP on the denitrifying process was different depending on the electron donor used

The results obtained in this work indicated that the cosubstrate had a very important role on the performance for 2-CP mineralization, as the specific oxidation rate of 2-CP was significantly increased. The results showed that the limiting step was the dechlorination and it was verified that phenol is an intermediate of the 2-CP oxidation. Likewise, nitrate was reduced to  $\text{N}_2$ . These evidences might be useful for the biological treatment of wastewaters containing 2-CP.

# **INTRODUCCIÓN**

# 1. INTRODUCCIÓN

En México se recibe un promedio anual de 1 489 kilómetros cúbicos de agua al año, de los cuales el 73.2% se evapora, el 22.1% escurre por ríos o arroyos y el 4.7 % restante se infiltra al subsuelo y recarga los acuíferos. De acuerdo con estas cifras, le correspondería a cada mexicano 4 288 m<sup>3</sup> de agua renovable por año (volumen que corresponde a una categoría de disponibilidad baja). No obstante, solamente el 2% del total (31 Km<sup>3</sup> /año) se destina al consumo (CNA, 2010).

El agua residual se genera del empleo del agua para un uso determinado (urbano, industrial, agrícola, entre otros). En México, las aguas residuales en el 2008 se estimaron en 13.45 Km<sup>3</sup> al año (aguas residuales municipales y no municipales), de las cuales sólo fue tratada el 27.5% (CNA, 2010). En el agua residual se pueden encontrar un gran número de contaminantes, los cuales se pueden definir como aquellos compuestos en exceso que afectan negativamente al ser humano, la flora, la fauna y/o el entorno. Entre los contaminantes de las aguas residuales podemos encontrar, principalmente, los compuestos nitrogenados y carbonados en diferentes formas. El nitrógeno llega a los cuerpos de agua como nitrato, nitrito y amonio generando problemas de toxicidad para los organismos acuáticos y la eutroficación de los cuerpos de agua (Laws, 1993). La contaminación del agua subterránea por nitrato es un problema que amenaza el abastecimiento de agua potable (Muñoz y col., 2004). Se sabe que una concentración alta de nitrato en el agua potable puede afectar la salud dado que puede provocar metahemoglobinemia en infantes y posiblemente cáncer (Forman, 1991). El nitrato es generado por muchas industrias como la de fertilizantes, explosivos, nuclear, entre otras. El nivel permitido de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en agua potable es de 10 ppm en Estados Unidos de Norteamérica (US EPA, 2003) y de 12 ppm en Europa, mientras que en México el límite máximo permisible es de 40 ppm de nitrógeno total (SEMARNAP, 1997).

En cuanto al carbono, se puede encontrar en las aguas residuales como polímeros, ácidos grasos volátiles, azúcares, compuestos orgánicos clorados, etc. proveniente de las



diversas actividades del ser humano. El agua residual urbana tiene un alto contenido de materia orgánica, que suele ser más fácilmente eliminada, que la de origen industrial. Además, también se pueden tener contaminantes provenientes de la industria en el agua residual urbana, debido a que algunas descargas de aguas industriales son depositadas en las redes del alcantarillado urbano. Así, pueden ser encontrados compuestos que por su solubilidad o estructura son muy lentamente consumidos y oxidados. Entre ellos se encuentran los compuestos aromáticos como el benceno o tolueno; o bien los de tipo fenólico como los isómeros del cresol o, el fenol mismo y sus derivados clorados o compuestos orgánicos de diversa índole. Dentro de los compuestos orgánicos clorados están los clorofenoles, los cuales han sido reconocidos como contaminantes orgánicos de aire, agua subterránea, suelo, sedimentos y aguas residuales (Fetzner, 1998). Dependiendo de su concentración, pueden ser tóxicos, ya que es posible que ocasionen daño en la membrana celular, así como desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (Bradberry y col., 2004). Se ha visto que, tienen tendencia a la bioacumulación al penetrar y permanecer en las membranas celulares.

Los clorofenoles son moléculas estables, (con valores de  $\Delta G^\circ$  menores de -170 KJ/reacción, para la deshalogenación reductiva con liberación de cloro), que se generan en diferentes industrias, como la del papel, durante el proceso de blanqueado. Los clorofenoles son el producto de la reducción de compuestos aromáticos policlorados. La industria de la pulpa y el papel ocupa el tercer lugar en términos de uso de agua dulce (Kallas y Munter, 1994). Los clorofenoles se utilizan para la preservación de la madera, así como para manufacturar herbicidas, fungicidas, insecticidas y tintes. El uso excesivo de pesticidas y herbicidas en la agricultura es una causa importante de la aparición de los monoclorofenoles en las aguas superficiales y subterráneas por la reducción de compuestos, tales como el 2,4 diclorofenol y el pentaclorofenol (Virtanen y Hattula, 1982; Seidler y col., 1986; U.S. EPA, 1993).

Se han desarrollado diferentes métodos para la eliminación de los compuestos orgánicos clorados. Estos han sido clasificados como métodos físicos, químicos,

electroquímicos y biológicos. Los tres primeros métodos parecen ser más rápidos, pero todo indica que son caros y generan contaminación colateral, son menos amigables que los procesos biológicos (Savant y col., 2006). Por lo anterior, se hace necesario contar con procesos de tratamiento eficaces y más económicos que permitan la eliminación de los clorofenoles de los diferentes cuerpos de agua que puedan estar contaminados, a saber, ríos, aguas subterráneas y aguas residuales, por señalar algunos casos. Para poder eliminarlos de manera más eficaz son necesarios más trabajos de investigación básica y aplicada.

### **1.1 Tratamiento biológico de aguas residuales**

Los sistemas de tratamiento biológico involucran el uso de microorganismos que transforman la materia orgánica en células nuevas o en biogás. También pueden eliminar algunos aniones inorgánicos (nitrato, nitrito, sulfato, sulfuro, fosfato, etc.). Los sistemas de tratamiento biológico pueden ser aerobios o anaerobios. Dentro de estos sistemas podemos encontrar a los lodos activados, lagunas aireadas y filtros percoladores, entre otros (Schneiter y col., 1984; Boller y Gujer, 1986; Zita y Hermansson, 1994). Los lodos activados utilizan tanques a los que se les suministra aire por medio de difusores mecánicos localizados en su interior. Durante el tratamiento, los microorganismos pueden formar flóculos que después se dejan sedimentar en un tanque de clarificación. Este sistema tiene altos costos energéticos y produce un mayor volumen de lodos (biomasa) que requiere tratamiento posterior (Von Sperling, 1996). Cabe señalar, además, que no es fácil tratar efluentes con altas concentraciones de materia orgánica, debido a los altos costos de operación que implica el consumo de oxígeno y de agitación.

Los procesos biológicos anaerobios podrían ser útiles para la eliminación de contaminantes cuando el oxígeno no está disponible, además de que se presenta como una alternativa económicamente atractiva para el tratamiento de aguas residuales industriales debido a que suelen producir una menor cantidad de lodos que el proceso aerobio. La eliminación anaerobia de la materia orgánica se ha descrito como un proceso multifacético en el que la materia polimérica compleja, como polisacáridos, son

hidrolizados por enzimas extracelulares, producidas por los microorganismos para facilitar su transporte o difusión a través de la membrana celular (Bal y Dhagat, 2001). En estos procesos respiratorios, los contaminantes pueden funcionar como donadores o aceptores de electrones. En la respiración anaerobia los aceptores de electrones son diferentes al oxígeno y pueden ser el nitrato, hierro férrico, sulfato o carbonato (Häggbloom y col. 1993). También se ha encontrado que algunos compuestos orgánicos pueden participar como aceptores de electrones en la respiración anaerobia (fumarato, óxido de trimetilamina), así como algunos compuestos orgánicos clorados en el proceso denominado descloración reductiva (Fetzner S. 1998; Madigan y col. 2004). Dentro de los procesos anaerobios podemos encontrar a la desnitrificación, metanogénesis, sulfato-reducción, entre otros.

## 1.2 Eliminación biológica de nitrógeno

La gran distribución del nitrógeno en el ambiente, incluyendo el agua potable, genera un problema ambiental serio alrededor del mundo. El nitrógeno está presente en diferentes formas, como compuestos orgánicos e inorgánicos con diferentes estados de oxidación que van desde -3 cuando está en forma de amonio hasta +5 cuando está en forma de nitrato. La presencia de estos compuestos nitrogenados en los efluentes, pueden afectar negativamente la calidad del agua. Los principales contaminantes nitrogenados en el agua son los iones de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrito ( $\text{N-NO}_2^-$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), que se utilizan como nutrientes para el crecimiento de plantas acuáticas, contribuyendo de esta manera en la disminución de oxígeno disuelto y acelerando el proceso de eutroficación de los cuerpos de agua donde son depositados. También pueden modificar la capacidad de los animales acuáticos para sobrevivir, crecer y reproducirse como consecuencia directa de la toxicidad de estos compuestos (Cervantes, 2009), o por la disminución de oxígeno ocasionada por eutroficación.

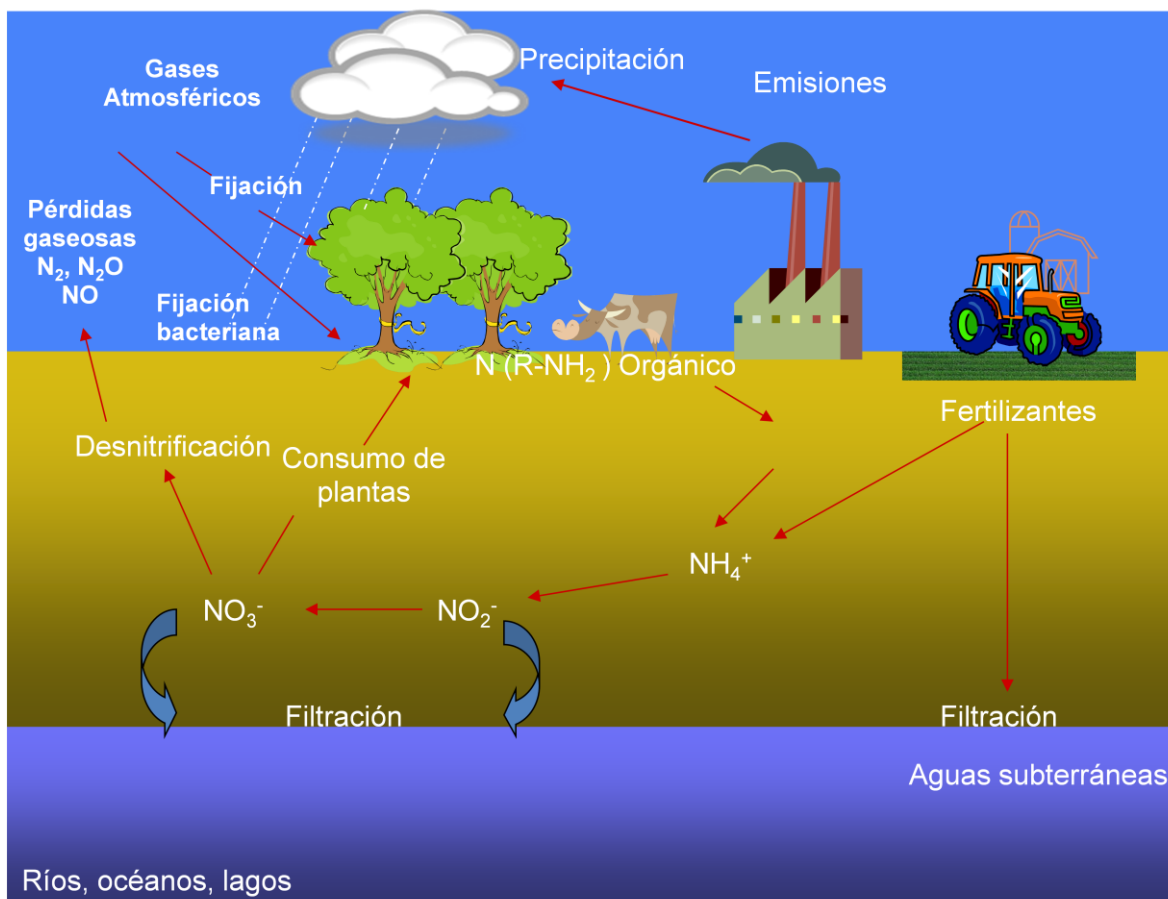
Los tres iones pueden ser tóxicos para la vida acuática especialmente para los peces, siendo el nitrito el más tóxico de los tres iones nitrogenados. El ión amonio es la forma usual de nitrógeno como nutriente para la mayoría de los organismos, sin

embargo el ión amonio es convertido en amoniaco cuando se incrementa el pH. A valores de pH de 9.4 o más altos, el equilibrio se desplaza hacia la formación de amoniaco.

El nitrato, por su parte, se ha observado que puede ocasionar metahemoglobinemia en niños. La metahemoglobinemia es una afección en la sangre originando cianosis y causando el síndrome del bebé azul. Clínicamente, es vista como una reducción de la metahemoglobina en la sangre, dando por resultado una reducción de la capacidad de acarrear oxígeno (Fan and Steinberg, 1996).

### **1.2.1 Ciclo del Nitrógeno**

El ciclo del nitrógeno es un ciclo dinámico, que involucra principalmente cuatro procesos microbiológicos: fijación del nitrógeno, mineralización, nitrificación y desnitrificación. Sin embargo, este ciclo es alterado por los seres humanos como resultado del aumento de la combustión de combustibles fósiles, la creciente demanda de nitrógeno en la agricultura y la industria, y las ineficiencias generalizadas en su uso (Galloway y col., 2008). El nitrógeno es un elemento abundante en la atmósfera, se encuentra como molécula diatómica ( $N_2$ ), y puede ser biológicamente reducido a  $NH_3$  por diazótrofos procariotas (como las cianobacterias) que fijan el  $N_2$  y el nitrógeno inorgánico producido es oxidado a nitrato (Figura 1.1) (Cabello y col, 2004). La fijación biológica del  $N_2$  es una etapa importante del ciclo del nitrógeno, que, generalmente, es un proceso estrictamente anaerobio. La formación de nitrato a partir de amonio es catalizado secuencialmente por dos grupos de bacterias aerobias: un grupo oxida el amonio a nitrito, el segundo grupo oxida el nitrito a nitrato, proceso conocido como nitrificación. El tercer proceso de importancia del ciclo del nitrógeno es la desnitrificación que permite la reducción del nitrato a  $N_2$  (producto final del ciclo) por medio de bacterias facultativas.



**Figura 1.1** El ciclo del Nitrógeno. El nitrógeno molecular es removido de la atmósfera y regresado a ella mediante una serie de reacciones de oxidación y reducción.

Algunos procesos biológicos se han desarrollado para la eliminación de compuestos nitrogenados, como una alternativa al proceso convencional de nitrificación-desnitrificación. Entre ellos, se puede encontrar al proceso conocido como SHARON (single reactor system for high activity ammonium removal over nitrite), que consiste de una nitrificación parcial (oxidación de amonio a nitrito) y su desnitrificación posterior (Hellings y col 1998); el proceso ANAMMOX (anaerobic ammonia oxidation), que es la oxidación anaerobia de amonio a nitrógeno molecular, empleando nitrito como aceptor de electrones (Broda, 1977; Strous y col., 1988; Strous 1999), el proceso llamado OLAND (oxygen limited autotrophic nitrification and denitrification), en el cual el amonio es oxidado a  $N_2$  con nitrito como aceptor de electrones bajo condiciones limitadas de

oxígeno (Kuai y Verstraete, 1998), entre otros. Aunque estos procesos presentan varias ventajas como una menor demanda de oxígeno, utilización de un solo reactor, entre otras, también tienen varias desventajas, como por ejemplo, en el arranque del reactor se pueden presentar competencia entre las bacterias autotróficas anammox y las bacterias desnitrificantes (Ahn, 2006).

Aunque existen también diversos métodos fisicoquímicos para la eliminación del nitrógeno, tales como: intercambio iónico, ósmosis reversa, catálisis y electrodiálisis, el uso de estos procesos está limitado por los altos costos de capital y energía. Además del problema que representa la generación de grandes volúmenes de desechos de salmuera (Shrimali and Singh, 2001). En contraste, los procesos biológicos como nitrificación seguida por la desnitrificación parecen ofrecer un tratamiento biológico para la eliminación del nitrógeno sin la necesidad de un post-tratamiento ya que el nitrógeno es transformado hasta  $N_2$ , por lo tanto podría ser un proceso costo-efectivo atractivo y amigable con el ambiente. Sin embargo, parece ser que son procesos más lentos que los fisicoquímicos, por lo que es necesario desarrollar procesos o reactores que mejoren las velocidades de reacción.

### 1.3 Nitrificación

La nitrificación es un proceso aerobio que permite la oxidación del amonio hasta nitrato, es llevado a cabo por bacterias quimiolitotrofas, pertenecientes a la familia Nitrobacteraceae. El proceso se lleva a cabo en dos etapas, las cuales involucran dos grupos diferentes de bacterias. En la primera etapa las bacterias amonio oxidantes (AOB) oxidan el amonio a nitrito, mediante dos pasos, el amonio es primero oxidado a hidroxilamina la que, posteriormente, se oxida a nitrito (Ecuación 3). En la segunda etapa las bacterias nitrito oxidantes (NOB) oxidan el nitrito a nitrato (Ecuación 4) (Bathe y col 2000). Las bacterias AOB se han clasificado en cinco géneros diferentes: *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosovibrio* y *Nitrosolobus*. Mientras que los géneros que se han encontrado de las bacterias nitrito oxidantes son *Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrococcus* y *Nitrospira*. Aunque recientemente se han observado arqueas nitrificantes (Konneke y

col., 2005). En cada etapa las bacterias utilizan amonio o nitrito como fuente de energía y oxígeno como aceptor de electrones. Como se mencionó antes, la oxidación de amonio a nitrito se lleva a cabo en dos pasos. En el primero, la enzima amonio monooxigenasa (AMO) cataliza la oxidación de amonio a hidroxilamina (NH<sub>2</sub>OH) (Ecuación 5) y en el segundo paso la enzima hidroxilamina oxidoreductasa (HAO) cataliza la oxidación de NH<sub>2</sub>OH a nitrito (Ecuación 6). (McCarty, 1999)



Como se aprecia en los cambios de energía ( $\Delta G^{\circ'}$ ) la transformación de NH<sub>2</sub>OH a nitrito es el paso en el que las bacterias amonio oxidantes obtienen principalmente su energía. Sin embargo, la producción de ATP es baja y, por lo tanto, se genera poca biomasa, porque podría estar limitada la disponibilidad de energía para la biosíntesis celular (Beristaín-Cardoso y col., 2009).

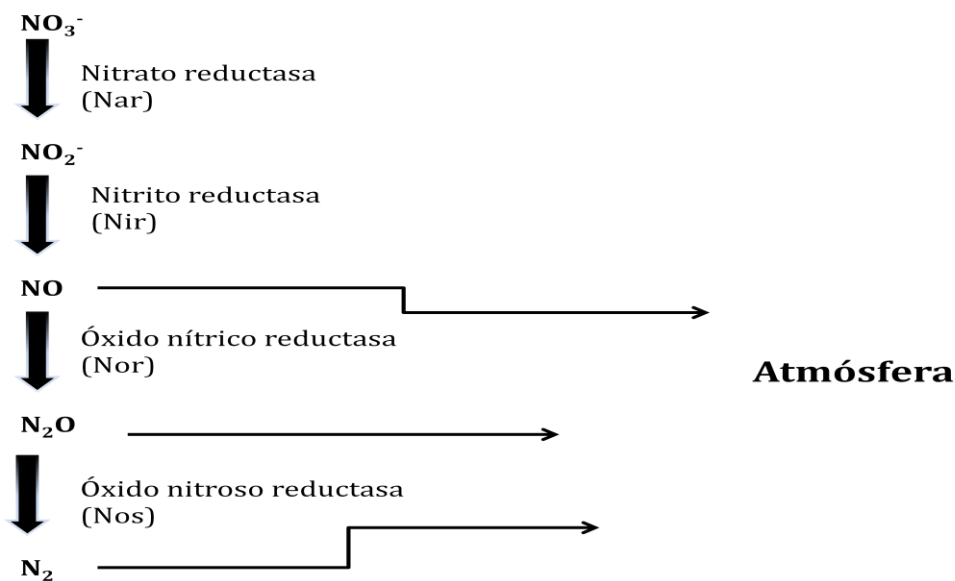
La oxidación de nitrito a nitrato es catalizada por el complejo enzimático llamado nitritooxidoreductasa (NOR). El nitrito es el donador de electrones, mientras que el oxígeno es el aceptor final de electrones. La energía libre obtenida de la oxidación del nitrito es solo de -74.1 kJ/mol, como consecuencia el crecimiento podría ser aún más escaso que en las AOB.

Entre los factores que afectan la nitrificación, se encuentran la temperatura, el pH, la concentración de amonio, la concentración de nitrito, la materia orgánica y bajas concentraciones de oxígeno. Se ha mencionado que las nitrito oxidantes pueden inhibirse por la concentración de nitrito debido a un posible cambio en el pH por la formación de ácido nitroso (Abeling y col., 1992), las nuevas alternativas buscan que ocurra este

fenómeno de acumulación de nitrito para inhibir la nitratación y de esta manera tener un menor consumo de oxígeno y poder acoplar el consumo de nitrito a otro proceso ya sea desnitrificación o Anammox.

### 1.4 Desnitrificación

La desnitrificación es una de las principales etapas del ciclo del nitrógeno. Contrarresta la fijación del  $N_2$  con la formación de  $N_2$  a partir de nitrato. En la desnitrificación el nitrato o nitrito son usados como aceptores terminales de electrones en la respiración, en lugar del oxígeno, proceso conocido como respiración anóxica. La desnitrificación es un proceso respiratorio anóxico organotrófico o litotrófico, que implica la reducción de nitrato ( $NO_3^-$ ) hasta  $N_2$  (Figura 1.2), aunque pueden ocurrir una desnitrificación parcial con acumulación de intermediarios nitrogenados (por ejemplo: óxido nitroso), lo cual dependerá de las condiciones ambientales que estén presentes como la estequiometría, pH, C/N, temperatura, sustrato, etc., (Betlach y Tiedje, 1981; Thomsen y col., 1994; Bing-Jie y Han-Qing, 2007).



**Figura 1.2** Ruta enzimática de la reducción del nitrato a  $N_2$ . La nitrato reductasa ha sido encontrada no sólo en bacterias desnitrificantes sino también en bacterias entéricas (*E. coli*), mientras que la nitrito reductasa parece estar presente en todas las bacterias desnitrificantes



### 1.4.1 Microbiología de la desnitrificación

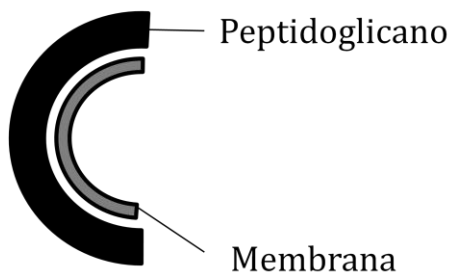
La desnitrificación es llevada a cabo por bacterias facultativas denominadas bacterias desnitrificantes. Sin embargo, recientemente se ha observado actividad desnitrificante no solo en bacterias sino en algunas Archaea y Eukarya (Hayatsu y col. 2008). Las enzimas nitrato y nitrito reductasas han sido encontradas en el genoma de Crenarchaeota y Euryarchaeota. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la información sobre su función y datos de secuencia no están disponibles (Cabello y col. 2004). Hacen faltan más estudios que ayuden a dilucidar las similitudes de las enzimas nitrato y nitrito reductasas de arqueas y bacterias. Dentro de Eukarya hay algunos hongos que tienen la capacidad de reducir el nitrato a  $N_2$  (Shoun y col. 1992). Las bacterias desnitrificantes tienen la capacidad de utilizar óxidos de nitrógeno como aceptores terminales de electrones en la bioenergética celular en condiciones anaerobias principalmente, aunque se ha reportado en condiciones microaerofilicas y ocasionalmente en condiciones aerobias (Bothe y col 2000). En la Tabla 1.1 se presentan algunos géneros bacterianos que desnitrifican. Las bacterias desnitrificantes son bioquímica y taxonómicamente muy diversas, incluyen géneros de todas las clases de proteobacterias. Algunas son heterótrofas y otras utilizan compuestos de un carbono, mientras que otras pueden crecer autotróficamente sobre  $H_2$ ,  $CO_2$  o compuestos reducidos de azufre como el sulfuro. La mayoría tienen todas las reductasas necesarias para la reducción de nitrato a  $N_2$  (Figura 1.2), sin embargo a algunas les falta la nitrato reductasa y son dependientes de nitrito. Otras bacterias les falta la óxido nitroso reductasa y tienen como producto final el  $N_2O$  (Knowles, 1982). Siendo al parecer, la enzima nitrito reductasa la que está presente en todas las bacterias desnitrificantes, de hecho a partir de esta enzima se han construido cebadores para realizar seguimientos poblacionales de las bacterias desnitrificantes (Braker y col., 1998).

**Tabla 1.1. Algunos géneros microbianos que incluyen bacterias con actividad desnitrificante**

<i>Clase</i>	<i>Orden</i>	<i>Familia</i>	<i>Género</i>
Alfa Proteobacteria	Sphingomonadales	Erythrobacteraceae	<i>Erythrobacter</i>
		Spirillaceae	<i>Aquaspirillum</i>
	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	<i>Azospirillum</i>
	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Paracoccus</i>
	Rhizobiales	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i>
Gamma Proteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	<i>Rhodopseudomonas</i>
	Aeromonadales	Aeromonadaceae	<i>Aeromonas</i>
	Oceanospirillales	Halomonadaceae	<i>Halomonas</i>
	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>
	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>
	Thiotrichales	Thiotrichaceae	<i>Beggiatoa</i>
	Vibrionales	Vibrionaceae	<i>Vibrio</i>
	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Xanthomonas</i>
Beta Proteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	<i>Achromobacter</i>
	Burkholderiales	Alcaligenaceae	<i>Alcaligenes</i>
	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	<i>Thiobacillus</i>
	Neisseriales	Neisseriaceae	<i>Chromobacterium</i>
	Neisseriales	Neisseriaceae	<i>Neisseria</i>
	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	<i>Azoarcus</i>
Delta Proteobacteria	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	<i>Desulfovibrio</i>
Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>

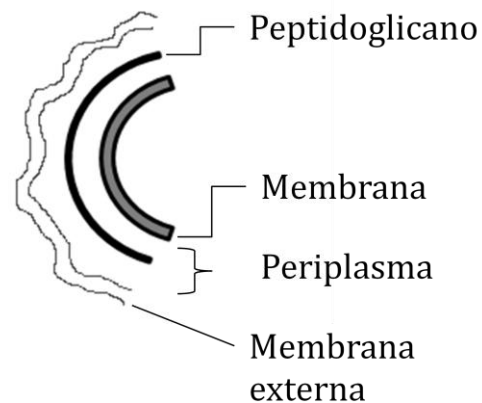
La mayoría de las bacterias desnitrificantes son gram negativas. Estas bacterias presentan dos membranas lipídicas (a diferencia de las gram positivas que solo presentan una membrana), en medio de ellas se localiza una delgada pared celular de peptidoglicano que, al teñirse con la tinción de gram, no retienen el colorante de ahí su nombre de bacterias gram negativas. El péptidoglicano es un polisacárido formado por cadenas de unidades alternadas de N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico. La membrana externa de las bacterias gram negativas ésta compuesta de fosfolípidos, polisacáridos y proteínas. Los lípidos y polisacáridos están estrechamente unidos formando estructuras estrechamente unidas denominadas lipopolisacaridos (LPS). La membrana externa es relativamente permeable a pequeñas moléculas, debido a la presencia de unas proteínas llamadas porinas, que actúan como canales de entrada y salida de sustancias hidrofílicas de bajo peso molecular. La pared celular de las gram negativas está compuesta por varias capas, mientras que la pared de las gram positivas suele ser más ancha (Figura 1.3). La región situada entre la membrana externa y la membrana interna se le denomina periplasma.

### Gram positiva



a)

### Gram negativa



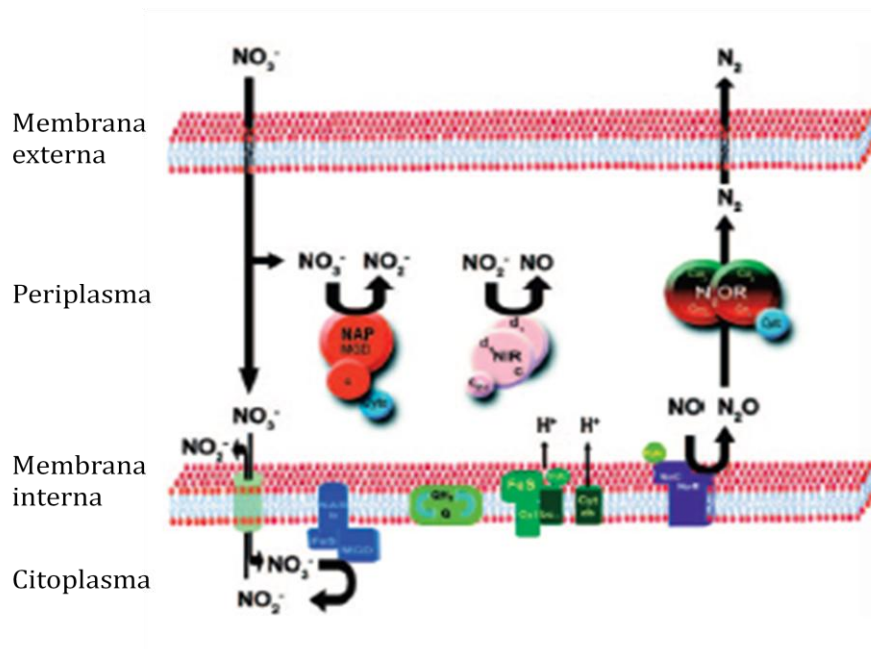
b)

**Figura 1.3.** Paredes celulares de bacterias gram positivas y gram negativas.

Una de las funciones de la membrana externa es retener algunas enzimas situadas en el periplasma, entre ellas las enzimas hidrolíticas, que llevan a cabo la transformación inicial de algunos nutrientes, proteínas de unión, que inician el proceso de transporte de sustratos y quimiorreceptores (Madigan y col. 2004)

#### 1.4.2 Bioquímica de la desnitrificación

En la desnitrificación intervienen una serie de enzimas que catalizan cada paso de reducción del nitrato a  $N_2$ . La enzima nitrato reductasa reduce el nitrato a nitrito; la nitrito reductasa cataliza la reducción de nitrito a NO, seguido por la óxido nítrico reductasa que reduce el NO a óxido nitroso y por último la óxido nitroso reductasa, cuyo producto final es el  $N_2$ . Estas enzimas desnitrificantes son sintetizadas cuando el oxígeno no está disponible (Betlach, 1981). En la Figura 1.4 se muestra un posible arreglo de las enzimas desnitrificantes en la célula bacteriana y a continuación se describen individualmente.

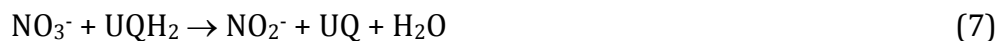


**Figura 1.4.** Modelo hipotético de la vía desnitrificante en *Pseudomonas stutzeri* propuesto por Lalucat y col., 2006.

#### **1.4.2.1 Primera etapa: nitrato reductasa (Nar, Nap).**

El nitrato se reduce a nitrito en el primer paso de la desnitrificación, por la nitrato reductasa. Existen dos tipos de nitrato reductasas desasimilativas que han sido encontradas en bacterias denitrificantes. Una es la nitrato reductasa unida a la membrana (Nar) y la otra es la nitrato reductasa localizada en el periplasma (Nap). La Nar está ampliamente distribuida encontrándose no sólo en bacterias desnitrificantes, sino también en bacterias entéricas como *E. coli*, donde se ha estudiado extensamente (Berks y col., 1995); además, ha sido estudiada en *Pseudomonas stutzeri*, *Paracoccus denitrificans*, *Bacillus holodenitrificans*, entre otras (Craske y Ferguson, 1986; Blüme y col., 1991, Ketchum y col., 1991). La Nar se compone de tres subunidades con masa molecular de 118 a 150 kDa para la subunidad  $\alpha$ , 55 a 64 kDa para la  $\beta$  y 19 a 21 kDa para la  $\gamma$  (Carlson y col., 1982; Ishizuka y col., 1984; Craske y Ferguson, 1986; Ketchum y col., 1991). La subunidad  $\alpha$  contiene molibdeno como cofactor, en forma de dinucleótido de molibdopterina y guanina, el cual es el sitio activo de la enzima. Esta enzima está anclada a la membrana citoplasmática por la subunidad  $\gamma$ . Las tres subunidades son codificadas por el operón *narGHJ*. La otra nitrato reductasa desasimilativa se encuentra en el periplasma, por lo que se conoce como nitrato reductasa periplasmática, y está compuesta por dos subunidades NapA y Nap B de 90 y 19 kDa, respectivamente (Berks, 1994). La subunidad grande contiene al cofactor molibdeno y al grupo [4Fe-4S]. Son codificadas por el operón *nap* (Ellington y col., 2006)

De igual forma ambas enzimas presentan características bioquímicas diferentes. La nitrato reductasa unida a la membrana utiliza al NADH como donador de electrones y su actividad es inhibida por azida (Bell y col., 1990). Mientras que la nitrato reductasa periplasmática no es sensible a bajas concentraciones de azida y no puede usar el NADH como donador de electrones. Además, la enzima nitrato reductasa periplasmática se expresa tanto en condiciones aerobias como en anaerobias (Bedzyk y col, 1999), mientras que la enzima unida la membrana sólo en condiciones anóxicas. La reacción de la Nar se podría esquematizarse de la siguiente manera (Jetten y col., 1997):



Donde: UQH<sub>2</sub> es ubiquinona reducida y UQ es ubiquinona.

Se ha estimado la Km aparente de la Nar en cultivos axénicos y en enzimas purificadas, obteniéndose valores desde de 0.15 μM hasta 15 mM (Betlach y Tiedje, 1981; Blüme y col., 1991; Ketchum y col., 1991; Sung y col., 2002). Estas diferencias pueden deberse a las condiciones ambientales empleadas así como al tipo de donador de electrones utilizado y el tipo de microorganismo, entre otros factores. Por ejemplo, Ketchum y col. (1991) observaron que la Km para reducción de nitrato a nitrito utilizando menadiol fue 50 veces más baja que cuando se utilizó metil viológeno. Sin embargo a pesar de esas diferencias los valores de Km nos indican una alta afinidad de la enzima por el sustrato

La actividad de la Nar se inhibe por azida, tiocianato, cianida, cloranfenicol y agentes que quelan o compiten con el molibdeno como el tungsteno (Carlson y col., 1982; Wu y Knowles, 1995).

#### **1.4.2.2 Segunda etapa: nitrito reductasa (Nir)**

En el segundo paso de la desnitrificación, el nitrito se reduce a óxido nítrico, reacción catalizada por la nitrito reductasa. Existen dos tipos de nitrito reductasas, ambas son estructuralmente diferentes pero funcionalmente equivalentes y se encuentran localizadas en el periplasma (Zumft, 1997). Una contiene cobre (Nir-Cu) y la otra contiene el citocromo cd<sub>1</sub> (Jetten y col., 1997), están codificadas por los genes *nirK* y *nirS* respectivamente. Ambos genes han sido encontrados en cepas diferentes de la misma especie por lo que se piensa que no existe relación entre el género o especie del microorganismo con el tipo de nitrito reductasa presente. Sin embargo se piensa que son genes mutuamente excluyentes (Coyne y col., 1989). La enzima citocromo cd<sub>1</sub> ha sido encontrada de manera más abundante en muestras ambientales, sin embargo la Nir-Cu, al parecer, está distribuida en un número mayor de grupos bacterianos (Ye y col., 1993).

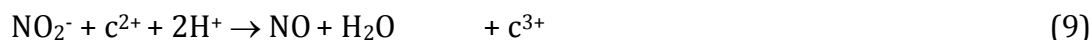
Los estudios realizados hasta el momento, indican que todas las bacterias desnitrificantes presentan alguno de estos dos genes.

La Nir-cd<sub>1</sub> es una enzima soluble en agua localizada en el periplasma, ha sido purificada de una gran variedad de bacterias desnitrificantes, incluyendo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Paracoccus denitrificans*, *Paracoccus pantotropha*, *Alcaligenes faecacalis*, *Pseudomonas stutzeri*, entre otras (Lams y Nicholas, 1969; Iwasaki y Matsubara, 1971; Gudat y col., 1973; Zumft y col., 1988; Moir y col., 1993). Esta enzima también puede reducir el oxígeno a agua. La enzima típicamente consiste de dos subunidades idénticas de masa molecular de 60 kDa, cada una contiene un grupo prostético hemo c covalentemente unido a la cadena de polipéptidos y un grupo hemo d<sub>1</sub> asociado no covalentemente con la proteína (Averill, 1996). El dominio hemo c es una estructura  $\alpha$ -helicoidal, parecida a la del citocromo clase I. El dominio del hemo d<sub>1</sub> consiste de una estructura  $\beta$ -hélice alrededor del hemo d<sub>1</sub> (Averill, 1996).

La Nir-Cu ha sido aislada de diversas bacterias desnitrificantes que incluyen especies de *Pseudomonas*, *Alcaligenesis*, *Bacillus*, *Rhodopseudomonas*, entre otros (Kakutani y col., 1981; Michalski y Nicholas, 1985; Zumft y col., 1987; Denariáz y col., 1991). Inicialmente, esta enzima fue reportada como un dímero de subunidades idénticas, con masa molecular de 30-40 kDa (Denariáz y col., 1991; Zumft y col., 1987). Sin embargo, ahora se conoce que, la mayoría si no todas, las Nir-Cu son triméricas con dos átomos de cobre por monómero (Godden y col., 1991). Cada subunidad tiene un átomo de cobre tipo 1 (cobre azul) y un átomo de cobre tipo 2 (cobre no azul). El átomo de cobre tipo 1 está ligado por 2His, Cis y Met, acepta un electrón de la proteína donador y muestra un intenso color azul o verde. El cobre tipo 2 está ligado por 3His y un solvente (H<sub>2</sub>O, OH<sup>-</sup>), es un centro de reducción del nitrito a NO (Suzuki y col., 1999).

Ambas enzimas, además de presentar diferencias estructurales, también presentan algunas diferencias bioquímicas. La enzima Nir-Cu presentó una inhibición de su actividad en presencia de dietilditiocarbomato mientras que la enzima citocromo cd1

no fue inhibida en presencia del quelante (Sphapleigh y Payne, 1985). Se ha observado que, a diferencia de Nir-cd<sub>1</sub>, Nir-Cu produce cantidades significativas de N<sub>2</sub>O a partir de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, pero solo cuando se acumulan niveles considerables de NO (Jackson y col., 1991). La reducción del nitrito se puede representar de siguiente la manera (Jetten y col., 1997):



Donde: c<sup>2+</sup> es citocromo reducido y c<sup>3+</sup> es citocromo oxidado.

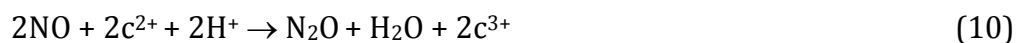
La Km de la reducción de nitrito a óxido nítrico por la Nir-cd<sub>1</sub> ha sido estimada en un intervalo de 6-46 μM (Lam y Nicholas, 1969; Gudat y col., 1973; Betlach y Tiedje, 1981). Mientras que la Km de Nir-Cu, ha sido estimada en un intervalo de 3.13-750 μM (Gudat y col., 1973; Michalski y Nicholas, 1985; Kakutani y col., 1981). Las diferencias en los valores de Km obtenidos se pueden deber a las condiciones ambientales empleadas y el tipo de microorganismo, entre otras. La actividad de la nitrito reductasa es inhibida por CN<sup>-</sup> (Silvestreni y col., 1994), así como por su producto NO, entre otros.

#### **1.4.2.3 Tercera etapa: óxido nítrico reductasa (Nor)**

En la tercera etapa, actúa la enzima óxido nítrico reductasa que se localiza en la membrana citoplasmática y cataliza la reducción de óxido nítrico a óxido nitroso (Carr y Ferguson, 1990). Se han descrito dos grupos de Nor; uno de cadena corta (450 aminoácidos), llamada scNor también llamada cNor (citocromo bc<sub>1</sub>) y otro de cadena larga (cerca de 760 aminoácidos) llamada lcNor, también conocida como qNOR (Lulucat 2006). Esta división corresponde a las especificidades del electrón donador: las cNor son parte de un complejo citocromo c, mientras que las lcNor obtienen sus electrones de hidroquinonas o menahidroquinonas. Las Nor más estudiadas son las cNor, que han sido aisladas de *Paracoccus halodenitrificans*, *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas stutzeri* (Heiss y col., 1989; Fujiwara y Fukumori, 1996; Sakurai y Sakurai, 1998). La Nor es



miembro de la gran familia hemo-cobre oxidasa y tiene una gran similitud con las c oxidasas. Es una enzima hemoproteína constituida por dos subunidades, una de 15-17 kDa que contiene un grupo hemo c y otra de 34-53 kDa que contiene un grupo hemo b. (Heiss y col., 1989; Fujiwara y Fukumori, 1996; Jetten y col., 1997). La subunidad catalítica de la Nor es un centro binuclear (de Alto y bajo espín). El centro de alto-espín contiene un grupo hemo de hierro y un segundo grupo metal nohemo (Fe), que es llamado FeB. El centro de bajo espín, un grupo hemo metal, actúa como un centro de transferencias de electrones entre el donador y el centro binuclear (Lulucat, 2006). La reacción de la Nor podría esquematizarse de la siguiente manera (Jetten y col., 1997):



Donde:  $\text{c}^{2+}$  es citocromo reducido y  $\text{c}^{3+}$  es citocromo oxidado

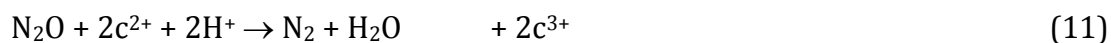
La  $K_m$  de la enzima purificada obtenida de *Paracoccus denitrificans* o *Pseudomonas stutzeri*, tuvo un valor en un intervalo de 0.25  $\mu\text{M}$  – 60  $\mu\text{M}$  (Heiss y col., 1989; Carr y Ferguson, 1990; Fujiwara y Fukumori, 1996). La actividad de la Nor puede ser inhibida por detergentes como el Tritón X-100, ácidos grasos volátiles, ionóferos, cianida, azida, entre otros (Jones y col., 1993; Wu y Knowles, 1995; Wu y col., 1995; Zumft, 1997)

#### **1.4.2.4 Cuarta etapa: óxido nitroso reductasa (Nos)**

La última etapa es la reducción del óxido nitroso a  $\text{N}_2$ , en este paso se completa la desnitrificación (Ecuación 11). Es catalizada por la óxido nitroso reductasa (Nos), y representa un proceso respiratorio ya que muchas bacterias, incluyendo *Escherichia coli*, son capaces de crecer utilizando  $\text{N}_2\text{O}$  como aceptor de electrones para la reducción de compuestos orgánicos. Es decir, que la reducción de óxido nitroso está acoplada a la conservación de la energía mediante la formación de ATP. La  $\text{N}_2\text{O}$  reductasa es una enzima soluble y está localizada en el periplasma ( $\approx 120$  kDa). Esta enzima ha sido estudiada en bacterias fotótrofas, heterótrofas y quimiolitótrofas. La enzima contiene

ocho átomos de cobre y está compuesta de dos subunidades presumiblemente idénticas (Coyle y col., 1985). En esta enzima periplasmática, al parecer el cobre es el único centro redox (Ferguson, 1994). Sin embargo se ha sugerido la forma homodimérica de aproximadamente 72 KDa en *A. cycloclastes* (Hulse y Averill, 1990).

La enzima exhibe, al parecer, un sitio catalítico llamado CuZ. Este comprende un grupo de cuatro iones de cobre unidos a siete histidinas y otros tres ligandos que de acuerdo con su estructura parecen ser OH<sup>-</sup> o H<sub>2</sub>O y, posiblemente, un ligando sulfuro (Rasmussen y col., 2000). La reducción del óxido nitroso podría representarse de la siguiente manera (Jetten y col., 1997):



Donde: c<sup>2+</sup> es citocromo reducido y c<sup>3+</sup> es citocromo oxidado

La Km de la reducción de óxido nitroso a N<sub>2</sub> ha sido estimada en un intervalo de 2-6 μM (SooHoo y Hollocher, 1991; Berks y col., 1993). La actividad de la Nos se afecta por el acetileno, CO, azida y cianida mediante una inhibición reversible y de tipo no competitivo, aunque el mecanismo se desconoce (Kristjansson y Hollocher, 1980).

Se ha sugerido que el paso más lento de la desnitrificación es la reducción de N<sub>2</sub>O a N<sub>2</sub> (Cervantes y col., 1998), por lo que es probable que haya acumulación transitoria de N<sub>2</sub>O. Lo cual representa un problema ambiental ya que se considera que el óxido nitroso representa un peligro potencial 300 veces más alto que el dióxido de carbono, ya que es un gas con efecto invernadero importante y se le atribuye una contribución del 6% en el calentamiento global (Henry y col., 2006).

### 1.4.3 Fisiología de la desnitrificación

En la desnitrificación es necesaria la presencia de un sustrato oxidable que suministre el poder reductor para la transformación de nitrato a N<sub>2</sub>. En la desnitrificación organotrófica, el poder reductor es suministrado por sustratos orgánicos

como acetato, etanol o glucosa (Akuna y col., 1993; Cuervo-López y col., 1999; Avad y col. 2010). De tal manera que, a través de este tipo de desnitrificación, se puede eliminar simultáneamente materia carbonada y nitrogenada. En la desnitrificación litoautotrófica, el  $H_2$  o compuestos reducidos de azufre ( $S^0$ ,  $S^{2-}$ ,  $S_2O_3^{2-}$ ,  $S_4O_2^{2-}$ ,  $SO_3^{2-}$ ) son usados como fuente de electrones, mientras que la fuente de carbono es dióxido de carbono, el cual es fijado a través del ciclo de Benson-Calvin (Kuenen y col., 1992). Además, es posible tener una desnitrificación lito-organotrófica, donde ambos compuestos orgánicos e inorgánicos son usados como fuentes de electrones (Beristain-cardoso 2008, Meza, Escalante y col., 2007, Reyes Avila 2004).

#### ***1.4.3.1. Fuentes alternativas de electrones***

La disponibilidad de la fuente de electrones es un factor muy importante que controla la actividad de los heterótrofos. El tipo de reductor utilizado puede influir en la actividad de las enzimas desnitrificantes. Hay algunos estudios que han evaluado el efecto de diferentes sustratos sobre la desnitrificación. En este sentido, Peng y col. (2007) utilizando etanol, acetato y metanol observaron que la velocidad específica desnitrificante fue mayor cuando se utilizó acetato (12 mg N/ g SSV h) y la menor fue cuando se utilizó metanol (3.2 mg N/ g SSV h). Recientemente, Adav y col., (2010) utilizando acetato, etanol o metanol como fuente de electrones, encontraron que la velocidad específica de consumo de nitrito fue distinta en los tres casos, siendo de 2.07, 1.6 y 1.2 mg N- $NO_2^-$ /g SSV h, respectivamente, siendo más alta con acetato. El acetato es un sustrato ampliamente empleado, debido a que se han obtenido, generalmente, valores de eficiencia cercanas al 100%, rendimientos y velocidades desnitrificantes grandes, comparado con otros sustratos (Tabla 1.2) (Cuervo-López y col., 1999; Peña-Calva y col., 2004; Martínez-Hernández y col., 2009). Es quizás por esta razón, que se ha sugerido que el uso de acetato podría mejorar la desnitrificación en la aguas residuales industriales (Ginige y col., 2005). También es probable que el tipo de fuente de carbono pudiera influir sobre la vía metabólica a seguir. Akuna y col. (1993), utilizando diferentes sustratos orgánicos (acetato, glicerol, glucosa, lactato y metanol) en presencia de nitrato

y nitrito, encontraron que, cuando se utilizó glucosa y glicerol, se favoreció el proceso fermentativo así como la desasimilación reductiva del nitrato a amonio (DNRA), mientras que con los sustratos restantes, la desnitrificación fue la vía principal. La fuente de electrones también puede influir en la acumulación de algunos intermediarios nitrogenados como el nitrito.

En varios trabajos se ha observado la acumulación de nitrito en cultivos en presencia de diversos compuestos fenólicos (Tschech y Fuchs, 1987; Thomas y col., 2002; Meza-Escalante y col., 2008; Cervantes y col., 2009). Meza-Escalante y col. (2008) proponen la posibilidad de que la enzima nitrito reductasa fue inhibida por la presencia del *p*-cresol.

El rendimiento energético obtenido por desnitrificación depende del donador de electrones utilizado. En la Tabla 1.3 se muestran los cambios en la energía libre de la desnitrificación en presencia de diferentes fuentes de electrones. Se puede observar que, en todos los casos, es un proceso exergónico y que los cambios en la energía libre dependen de la fuente de electrones utilizada. En términos cinéticos, las diferencias obtenidas también van a depender del donador de electrones utilizado. En cuanto al rendimiento energético, en términos generales podemos decir que la desnitrificación organotrófica tiene un rendimiento energético mayor comparado con la desnitrificación litotrófica (Tabla 1.3).

Además de la fuente de electrones, existen otros factores que pueden inducir y /o controlar el proceso desnitrificante, como el oxígeno, presencia de óxidos de nitrógeno, etc. Así como también se puede considerar el efecto que ocasionan diversos factores ambientales, como el pH, la temperatura, la relación carbono/nitrógeno (C/N), entre otros.

**Tabla 1.2** Parámetros cinéticos de la eliminación de diferentes fuentes de carbono por desnitrificación.

Donador	cultivo	qc <sup>a</sup>	qn	Ec	E <sub>NO3<sup>-</sup></sub>	Y <sub>HCO3<sup>-</sup></sub>	Y <sub>N2</sub>	Ref.
Acetato	Continuo UASB	—	—	97.0 ± 2	99.0 ± 1	0.78 ± 0.03	0.82 ± 0.08	Martínez-Hernández y col., 2009
Acetato	Continuo UASB	—	114.69 <sup>b</sup>		99.8			Cuervo López y col., 1999
Acetato	Lote	410 ± 20	340 ± 18	98 ± 0.5	99 ± 0.6	0.98 ± 0.01	0.98 ± 0.02	Peña-Calva y col., 2004
Benceno	Lote	0.25 <sup>c</sup>						Burland y Edwards, 1999
Fenol	Lote	83 ± 8	86 ± 2	100%	100%	0.9 ± 0.03	≈ 1	Beristain-Cardoso y col., 2009
p-cresol	Lote	180 ± 4.0	200 ± 8.0	—	—	0.74 ± 0.004	0.48 ± 0.002	Cervantes y col., 2009
Tolueno	Lote			100	100	0.83 ± 0.02	0.96 ± 0.02	Peña-Calva y col., 2004
m-Xyleno	Lote			45 ± 0.6	45 ± 0.8	0.86 ± 0.01	0.96 ± 0.03	Peña calva y col., 2004

a mg C o N/g SSV d

b mg C o N/ g ML SSV h

c mg C o N/L d

**Tabla 1.3** Valores de  $\Delta G^{\circ}$  para el proceso desnitrificante en presencia de diferentes fuentes de electrones.

Sustrato	Ecuación	$\Delta G^{\circ}$ (kJ/reacción)
H <sub>2</sub>	$H_2 + 0.4 NO_3^- + OH + 1.4H^+ \rightarrow 0.2N_2 + 2.2H_2O$	-222
Metanol	$CH_4O + 1.2 NO_3^- + 0.2H^+ \rightarrow 0.6N_2 + HCO_3^- + 1.6H_2O$	-649
Ácido acético	$CH_3COOH + 1.6 NO_3^- \rightarrow 2CO_2 + 0.8N_2 + 1.6OH^- + 1.2H_2O$	-843
Etanol	$C_2H_6O + 2.4NO_3^- + 0.4H^+ \rightarrow 1.2N_2 + 2HCO_3^- + 2.2H_2O$	-1230
Glucosa	$C_6H_{12}O_6 + 4.8NO_3^- \rightarrow 2.4N_2 + 6HCO_3^- + 1.2H^+ + 2.4H_2O$	-2686
Benceno	$C_6H_6 + 6NO_3^- \rightarrow 3N_2 + 6HCO_3^-$	-2977
Tolueno	$C_7H_8 + 7.2NO_3^- + 0.2H^+ \rightarrow 3.6N_2 + 7HCO_3^- + 0.6H_2O$	-3524
Xileno	$C_8H_{10} + 8.4NO_3^- + 0.4H^+ \rightarrow 4.2N_2 + 8HCO_3^- + 1.2H_2O$	-4136
Fenol	$C_6H_6O + 5.6NO_3^- + 0.2H_2O \rightarrow 2.8N_2 + 6HCO_3^- + 0.4H^+$	-2818
p-cresol	$C_7H_8O + 6.8NO_3^- \rightarrow 3.4N_2 + 7HCO_3^- + 0.2H^+ + 0.4H_2O$	-3422
2-clorofenol	$C_6H_5ClO + 5.2NO_3^- + 1.4H_2O \rightarrow 2.6N_2 + 6HCO_3^- + 1.8H^+ + Cl^-$	-2742
sulfuro	$S^{2-} + 1.6NO_3^- + 1.6H^+ \rightarrow SO_4^{2-} + 0.8N_2 + 0.8H_2O$	-743

### 1.4.3.2 Efecto del oxígeno

El oxígeno puede tener un efecto a nivel de transcripción enzimática o bien a nivel de actividad de la propia enzima. Con respecto al nivel de transcripción, la mayoría de las bacterias desnitrificantes requieren condiciones de anoxia para que las enzimas desnitrificantes se sinteticen. Este mecanismo se desconoce, sin embargo se cree que participa el producto del gen *fnr*, que se requiere para la expresión de los genes anaerobios en *E. coli*. (Ferguson, 1987). El regulador transcripcional de *E. coli* FNR controla la expresión de muchos genes requeridos para el metabolismo anaerobio. Estos actúan como sensores del nivel de oxígeno y activadores de los genes reguladores. Genes funcionales homólogos de FNR están presentes en Proteobacterias facultativas (Unden y col., 1995).

Existe evidencia que sugiere que el control del oxígeno sobre la nitrato reducción parece residir en el transporte del nitrato a través de la membrana citoplasmática (Hernández and Rowe, 1988). El grado de inhibición parece depender del tipo de enzima y del tipo de microorganismo. Por ejemplo, en cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* el consumo de nitrato se inhibió por la presencia de oxígeno (0.2% de saturación) (Hernandez y Rowe, 1987); mientras que Davies y col. (1989) encontraron que *Paracoccus denitrificans* es capaz de reducir el nitrato hasta óxido nitroso en presencia de oxígeno. Los estudios realizados hasta el momento indican que el oxígeno afecta el consumo de nitrato en un intervalo de concentraciones de 0.08 a 7.7 mg de oxígeno/L (Wilson and Bouwer, 1997). Las diferencias encontradas en el intervalo de concentración de oxígeno pueden depender de la concentración celular, concentración de nitrato e incluso el tipo de donador de electrones utilizado. También se ha observado que la enzima óxido nitroso reductasa es más sensible a la presencia de oxígeno que las otras enzimas que participan en las etapas del proceso desnitrificante, ya que se ha observado en varios trabajos la acumulación de óxido nitroso en presencia de oxígeno (Betlach y Tiedje, 1981; Hochstein y col., 1984). Las evidencias muestran que la presencia de oxígeno también podría afectar la reducción de nitrato a  $N_2$ , afectando el rendimiento y la eficiencia de consumo, debido a un posible consumo de las fuentes donadoras de electrones.

#### **1.4.3.3 Efecto de los óxidos de nitrógeno**

Los óxidos de nitrógeno tienen también diversos efectos sobre el proceso desnitrificante. El efecto del nitrato es quizás el mejor estudiado, se ha observado que la velocidad de la desnitrificación depende de la concentración de nitrato (Knowles, 1982), también se ha observado que concentraciones altas de nitrato inhiben completamente el proceso (Blackmer y Bremner, 1978). Sin embargo, se ha reportado que concentraciones hasta 6.2  $NO_3^-$  g/L no inhiben la reducción de  $N_2O$  en *Alcaligenes odorans* (Betlach y Tiedje, 1981). El nitrito disminuye la actividad desnitrificante a partir de una concentración 0.4 g  $NO_2^-$ /L (Shimizu y col., 1978). Algunos autores han sugerido que la

inhibición que se presenta es debida a la disminución en el valor de pH por la formación de ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) (Glass y col., 1995; Baumann y col., 1997). Sin embargo, los datos de la concentración de biomasa utilizada no se menciona y las respuesta del cultivo está estrechamente ligada a este parámetro. Por otro lado, se ha observado que la presencia inicial de nitrato estimula la expresión de todas las reductasas en *Pseudomonas stutzeri*, nitrito y óxido nitroso estimulan la enzima respectiva (Körner y Zumft, 1989).

#### **1.4.3.4. Efecto del pH y la temperatura**

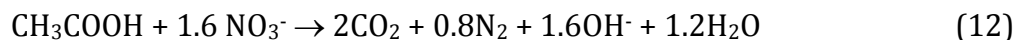
El proceso desnitrificante se desarrolla en un amplio intervalo de pH (6-9), sin embargo, todo indica que, a valores bajos de pH, se presenta una inhibición sobre la reducción de óxido nitroso, presentándose una acumulación de óxido nitroso y disminuyendo la eficiencia de formación de  $\text{N}_2$  (Thomsen y col., 1994, Li y col., 2008). Este fenómeno, generalmente, se asocia con la formación de ácido nitroso, que es más tóxico que el nitrito. Se ha sugerido que el  $\text{HNO}_2$  actúa como un desacoplante de protones (Almeida y col. 1995). Al parecer, cuando el pH es menor a 5 el producto principal suele ser  $\text{NO}$  y  $\text{N}_2\text{O}$ , para valores de pH arriba de 7 el producto principal suele ser  $\text{N}_2$  (Wicht, 1996).

La temperatura es un factor relevante, ya que incide en la velocidad específica de consumo de nitrato y en la velocidad específica de crecimiento de los microorganismos. El proceso desnitrificante se puede llevar a cabo en un intervalo de temperatura entre 5 y 35 °C (Lalucat y col., 2006), sin embargo, se ha observado que, a bajas temperaturas, se incrementan las emisiones de oxido nitroso y/o  $\text{NO}$ , y disminuye la formación de  $\text{N}_2$  (Bailey y Beauchamp, 1973; Bailey, 1976; Dobbie y Smith, 2001). También se ha reportado que la velocidad específica de consumo de carbono disminuye cuando disminuye la temperatura en la desnitrificación organotrófica (Elefsiniotis y Li 2006). La temperatura podría generar cambios en la membrana celular (Miller y Koshland, 1976) o, incluso, en la expresión genética que podrían afectar el consumo de los sustratos.

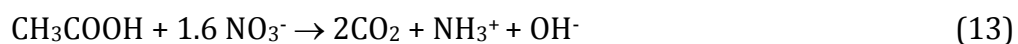


#### 1.4.3.5. Efecto de la relación carbono/nitrógeno (C/N)

Otro factor relevante es la C/N, generalmente se toma como punto de partida la C/N estequiométrica. Distinguiéndose tres etapas: 1) Cuando la C/N es menor que la estequiométrica la desnitrificación suele ser incompleta, quedando un residual de nitrato; 2) cuando la C/N es la estequiométrica la desnitrificación es generalmente, completa, obteniéndose como producto final  $N_2$  y 3) cuando la C/N es mayor a la estequiométrica es probable que ocurra la desnitrificación seguida por la metanogénesis de la materia orgánica residual, lo previamente se ha reportado (Lin y Chen, 1995). La C/N incluso puede orientar la desnitrificación o la desasimilación reductiva del nitrato a amonio (DNRA), esto fue observado por Akunna y col., 1994 que utilizando relaciones C/N entre 1.38 y 5.64 observaron que conforme la relación C/N decrecía la DNRA también disminuía. Es decir, cuando existe una C/N baja es probable que ocurra la desnitrificación puesto que esta reacción, libera más energía por nitrato reducido que la DNRA (Ecuación 12 y 13), mientras que a C/N altas, hay más poder reductor y esto puede favorecer que la DNRA se presente, así como la metanogénesis. También se ha observado que la relación C/N puede estar relacionada con la acumulación de intermediarios desnitrificantes como el nitrito (Oh y Silverstein, 1999).



$$\Delta G^{\circ} = -843 \text{ kJ/reacción}$$



$$\Delta G^{\circ} = -533 \text{ kJ/reacción}$$

#### 1.4.4 Cinética del proceso respiratorio desnitrificante

Existen diversos modelos que tratan de hacer predicciones de la desnitrificación involucrando el crecimiento microbiano. Sin embargo, en el tratamiento de las aguas residuales no es deseable la formación de biomasa porque se requiere un tratamiento posterior de los lodos producidos. Es por ello que los procesos microbianos deberían ser

desasimilativos, procurando que la formación de biomasa sea insignificante (Cuervo-López y col., 2009). La cinética de la desnitrificación se puede representar de acuerdo al modelo de Michaelis-Menten siguiendo la secuencia de sus reacciones enzimáticas:  $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$ . En donde cada paso seguiría el modelo cinético de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{V_{\max} S}{K_m + S} \quad (14)$$

En donde S es concentración de sustrato,  $V_{\max}$  es la velocidad máxima y  $K_m$  es la constante de afinidad enzima-sustrato.

Sin embargo, cuando se utilizan microorganismos como catalizadores, el modelo que podría representar la cinética de la desnitrificación es el modelo de Monod. De manera que la cinética de la desnitrificación, tomando en cuenta ambos sustratos, se podría representar de la siguiente manera:

$$v = \mu_m * \left[ \frac{S}{K_s + S} \right] * \left[ \frac{N}{K_n + N} \right] \quad (15)$$

Donde  $\mu_m$  es la velocidad máxima de crecimiento, K es la constante de saturación respectiva y S es la concentración de sustrato. Sin embargo, se ha considerado que la desnitrificación es independiente de la concentración de nitrato, debido a que el valor de  $K_n$  (constante de saturación del nitrato) es muy bajo, alrededor de 0.1 g N- $\text{NO}_3^-$ /L (Cervantes y col. 2000), dependiendo de las condiciones de cultivo.

Cuando el crecimiento no es medible o tenemos un proceso desasimilativo, la ecuación modificada de Monod podría ser utilizada, porque relaciona la concentración del sustrato y sus propiedades químicas de manera que permitiría caracterizar el proceso. Esta ecuación es la siguiente:

$$q_s = \frac{q_{\max} S}{K_s + S} \quad (16)$$

Donde  $q_{\max}$  es la máxima velocidad de consumo del sustrato,  $K_s$  es la constante de saturación del sustrato y  $S$  la concentración de sustrato.

Por otro lado, otra manera de representar la desnitrificación es a través de una expresión matemática que represente el consumo del sustrato, formación de biomasa ( $S_x$ ), y producto ( $S_p$ ) en función del tiempo (ecuación 17). Considerando que en un proceso eficiente el sustrato residual es cercano a cero, no hay acumulación de intermediarios y el sustrato que se va a mantenimiento es muy bajo.

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{dS_x}{dt} + \frac{dS_p}{dt} \quad (17)$$

En muchos procesos biológicos la velocidad volumétrica de consumo  $dS/dt$  es una cinética de primer orden. Entonces la velocidad volumétrica ( $r$ ) se puede representar de la siguiente manera:

$$r = -\frac{dS}{dt} = q_s \cdot X \quad (18)$$

Tomando en cuenta que:

$$\frac{dS_x}{dt} = \frac{\mu X}{Y_{x/s}}; \quad \frac{dS_p}{dt} = \frac{q_p X}{Y_{p/s}} \quad (19)$$

Sustituyendo las ecuaciones (18 y 19) en la ecuación (17), se tiene:

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{x/S_x}} + \frac{q_p}{Y_{p/S_p}} \quad (20)$$

Donde  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento,  $Y_x/S_x$  es el rendimiento de formación de biomasa respecto al sustrato consumido,  $Y_p/S_p$  es el rendimiento de formación de producto respecto al sustrato consumido,  $q_p$  velocidad específica de formación de producto. En esta ecuación se resume el metabolismo del cultivo desnitrificante, donde  $\mu / (Y_x/S_x)$ , expresa el anabolismo y  $q_p / (Y_p/S_p)$  el catabolismo (o el proceso respiratorio). En procesos desasimilativos, la velocidad específica de crecimiento puede ser muy pequeña, teniendo rendimientos de formación de biomasa pequeños, entonces  $\mu / (Y_x/S_x)$  puede considerarse como insignificante. En otras palabras el principal proceso sería respiratorio (Cuervo-López y col., 2009). En este sentido Cuervo-López y col (1999), Reyes y col. (2004) han mostrado que el proceso desnitrificante puede ser desasimilativo, con valores de rendimientos de bicarbonato y  $N_2$  cercanos a 1.

## 1.5 Clorofenoles

Los clorofenoles pertenecen a los compuestos orgánicos halogenados quienes, debido a su uso y mal uso en la industria y la agricultura, constituyen uno de los grupos químicos más grandes dispersos en el ambiente. Si bien es conocido que un gran número de compuestos orgánicos halogenados son el resultado de actividades antropogénicas, es igualmente importante hacer notar que estos compuestos también se producen naturalmente (Hägglom y Bossert, 2003).

Las características fisicoquímicas de los compuestos halogenados van de la mano con el grupo sustituyente (F, Cl, Br, o I). Siendo el enlace carbono-flúor el más fuerte y con alta polaridad. Conforme se incrementa la masa atómica del sustituyente, la fuerza del enlace disminuye, siendo  $F > Cl > Br > I$ . El tamaño y forma del sustituyente puede afectar la reactividad, debido a las limitaciones estéricas y puede dificultar el consumo en las células y el ataque enzimático en la biodegradación (Hägglom y Bossert, 2003).

### 1.5.1 Propiedades fisicoquímicas de los clorofenoles

Los clorofenoles son compuestos organoclorados cuya estructura consta de un anillo bencénico, un grupo hidroxilo y uno o varios átomos de cloro. En total existen 19 tipos de clorofenoles, difieren entre sí en la cantidad y posición del grupo cloro. Pero se puede subdividir en cinco grupos: monoclorofenoles, diclorofenoles, triclorofenoles, tetraclorofenoles y pentaclorofenol. La mayoría de los clorofenoles son sólidos a temperatura ambiente, con excepción del 2-clorofenol que es líquido. Son compuestos con un fuerte olor y sabor medicinal. Los clorofenoles tienen umbrales organolépticos muy bajos, por lo que se pueden percibir en el agua en cantidades muy pequeñas, a nivel de partes por billón (ppb). Para el 2-CF se han reportado umbrales de sabor y olor de 0.1  $\mu\text{g/L}$  y 10  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente (OMS, 2003). Han sido clasificados como contaminantes prioritarios por la EPA (2003) (Environmental Protection Agency).

Como se observa en la Tabla 1.4, la solubilidad en agua de los clorofenoles disminuye conforme se incrementan el nivel de cloración. A su vez, su acidez se incrementa conforme el número de cloros aumenta. De igual manera, el coeficiente de partición octanol-agua también se incrementa conforme el número de cloros (Tabla 1.4), indicando una posible tendencia de los clorofenoles más clorados a la bioacumulación (Chiou y col., 2005). El pH, oxígeno, presencia de otras sustancias orgánicas e inorgánicas, temperatura y estructura del compuesto puede afectar el transporte y transformación de los clorofenoles en el medio natural (Czaplicka y col. 2004).

### 1.5.2. Efectos biológicos de los clorofenoles (Toxicidad de los clorofenoles)

La toxicidad se define como la capacidad de una sustancia para afectar adversamente sistemas biológicos. Está, usualmente, relacionada con el tiempo y grado de exposición, la dosis y propiedades del sistema biológico involucrado (Czaplicka y col. 2004).

**Tabla 1.4.** Propiedades fisicoquímicas de los clorofenoles

	Fenol	2-CF	4-CF	2,4-DCF	2,4,6-TCF	PCF
Peso molecular (g/mol)	94.11	128.56	128.56	163.0	197.45	266.34
Apariencia	Sólido, blanco-incoloro	Líquido ámbar	Cristales incoloros	Cristales incoloros	Cristales incoloros	Cristales incoloros
Solubilidad a 20 °C (g/L)	83	28	27	4.5	0.434	0.014
Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	1.07	1.262		1.38	1.49	1.98
Coefficiente de partición octanol/agua como log Kow	1.57	2.29	2.35-2.44	3.17	3.67 o 3.87	5.02
Presión de vapor a 20 °C (mm Hg)		0.99	0.23	0.14	0.03	0.0002
Punto de fusión (°C)	40.5 °C	9.4 °C	42-44 °C	42-43 °C	69 °C	191 °C
Punto de ebullición (°C)	181.7 °C	174.9 °C	217 °C	210 °C	246 °C	309 °C
pKa	9.95	8.56	9.18	7.68	6.0	4.7 o 5.01

Al parecer, la toxicidad de los clorofenoles está relacionada con el grado de cloración y la proximidad del cloro al grupo hidroxilo. La toxicidad es más baja en clorofenoles con un cloro en posición *orto* comparado con clorofenoles con el mismo número de cloros en posición *meta* o *para*. También se ha observado que los efectos tóxicos primarios están relacionados con la destrucción de la membrana e inhibición de la fosforilación oxidativa. Este bloqueo de la fosforilación oxidativa puede ocurrir por interferencia con la liberación de hidrógeno a la cadena de transporte de electrones; inhibición de la transferencia de electrones a lo largo de la cadena de transporte de electrones al oxígeno; interferencia con la liberación de oxígeno al transportador terminal de electrones (citocromo oxidasa); o inhibición de la actividad de la trifosfato de adenosina (ATP) sintasa (Pepelko y col., 2005). Otro estudio muestra que los clorofenoles actúan, principalmente, inhibiendo la ATP sintasa (Gregus y Klaassen,

2001). Los clorofenoles son químicos protonóforos, que importan protones a través de la membrana, disipando el gradiente de protones que maneja el flujo controlado de protones dentro de la matriz, que a su vez maneja la síntesis de ATP (Gregus y Klaassen, 2001).

La toxicidad de los clorofenoles también puede estar relacionada con el coeficiente de partición octanol/agua ( $\log K_{ow}$ ) (Smith y col. 1994). Esto sugiere que la lipofilidad es un factor importante que influye en la toxicidad, entre más grande sea el coeficiente  $K_{ow}$  más tóxico podría ser el compuesto.

Debido a su amplia distribución en el ambiente (agua, aire, suelo, alimentos), los clorofenoles pueden ser absorbidos por todas las rutas de exposición humanas, ingestión, inhalación y dérmica. Sin embargo, hay pocos estudios en donde se evalúe su efecto sobre los mamíferos. Se ha encontrado que los clorofenoles penetran rápidamente la piel (Roberts y col., 1977), parecen no acumularse en el cuerpo de la rata, ya que son rápidamente metabolizados y eliminados a través de la orina en forma de conjugado glucurónico (Somani y Khalique, 1982). Sin embargo, cuando hay periodos largos de exposición a altas dosis, se ha observado un aumento en el número de crías nacidas muertas y una disminución en el tamaño de la camada (Exon y Koller, 1982). La Agencia Internacional para Investigación sobre el Cáncer (IARC) ha enlistado estos compuestos como carcinógenos 2B (IARC, 1986). El pentaclofenol (NTP, 1997) y 2,4,6-triclorofenol (NTP, 1989) son carcinógenos en animales, mientras que 2-CF, 3-CF y 2,4 DCF son promotores de tumores en piel de ratón (Boutwell y Bosch, 1959).

### **1.5.3 Eliminación fisicoquímica de los clorofenoles**

Se han desarrollado procesos para el tratamiento de los clorofenoles presentes en el ambiente. Existen métodos físicos (como es el caso de la adsorción o sonicación), métodos químicos como los procesos de oxidación avanzada (PAO) y métodos

electroquímicos, entre otros. Para el proceso de adsorción se han utilizados diversos materiales adsorbentes como: carbón activado granular, bentonita, sepiolita, diversos óxidos de metales, entre otros (Nelson y Yang, 1995; Bandara y col., 2001; Yu y col., 2010). Se han obtenido diferentes capacidades adsorptivas dependiendo del material que se utiliza, sin embargo, este tipo de procesos solo transfieren el compuesto a otro lugar pero no lo eliminan. Por otro lado, los procesos de oxidación avanzada, al parecer producen mejores resultados en términos de velocidad y de una mayor eliminación del contaminante. Entre los procesos PAO se pueden encontrar procesos basados en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2 + UV$ , Fenton, foto-Fenton), fotólisis, fotocatalisis, procesos basados en el ozono ( $O_3$ ,  $O_3 + UV$ ,  $O_3 + catalizador$ ), entre otros (Pera-Titus y col., 2004). Los PAO producen diferentes productos dependiendo del tratamiento elegido. Por ejemplo, en el tratamiento de 4-clorofenol por fototransformación, se puede obtener como producto benzoquinona o hidroquinona (Boule y col., 1999). Zimbron y Reardon (2009), utilizaron la reacción de Fenton para la transformación del pentaclorofenol, encontrando a la tertraclorohidroquinona y al ácido dicloromaleico como intermediarios, sin embargo, la mineralización (transformación a  $CO_2$ ) de la materia orgánica no fue observada. De manera general podemos decir que, a pesar de que los métodos fisicoquímicos son rápidos generan en la mayoría de los casos productos secundarios (algunos tóxicos) que tienen que ser eliminados a través de la combinación de distintos procesos, lo que eleva su costo. Debido a esto, los procesos biológicos son más amigables con el ambiente que los procesos fisicoquímicos.

## **1.5.4 Eliminación biológica de los clorofenoles**

### ***1.5.4.1 Eliminación aerobia***

Diversos estudios se han realizado para investigar la eliminación aerobia de los clorofenoles, utilizando cultivos axénicos y cultivos mixtos (Schmidt col., 1983; Farrel y



Quilty, 1999; Loh y Wang, 2006). Se ha reportado que una gran variedad de bacterias pueden utilizar a los clorofenoles como fuente de carbono y energía en condiciones aerobias. Entre estas bacterias podemos encontrar a los géneros: *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Athrobacter*, *Alcaligenesis*, entre otras (Tyler y Finn, 1974; Finkel'shtein y col., 2000; Hollender y col. 2000; Nordin y col., 2005). Buitrón y Andrade (2011), evaluaron en un reactor de lotes secuenciados (SBR), la eliminación de fenol, 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol encontrando eficiencias de eliminación del 98% y una velocidad específica de 28 mg de fenoles totales/g SSV h. También se ha reportado que, algunas veces, el consumo de estos compuestos podría ser a través del cometabolismo utilizando sustratos análogos como el fenol (Lo y Wu 2006; Cobos-Vasconcelos y col., 2006) o sustratos de fácil oxidación como la glucosa (Lee y Lee 2007). Por ejemplo, Loh y Wu (2006) evaluaron la transformación de 2-clorofenol y 4 clorofenol por *Pseudomonas putida*, encontrando que la cepa fue incapaz de utilizar los clorofenoles como fuente de carbono y energía, sin embargo, en presencia de fenol se transformó el 80% del 4-clorofenol y el 50 % del 2-clorofenol a través del cometabolismo. Sin embargo, no se indica cuales fueron los productos de la transformación de los clorofenoles.

Suelen utilizarse dos estrategias para metabolizar estos compuestos como fuente de carbono y energía (Solyanikova y Golovleva, 2004). Los fenoles policlorados (3 a 5 cloros) son convertidos a clorohidroquinonas como intermediarios (vía hidroquinona) (Field y Sierra-Alvarez, 2007). Por otro lado, en los clorofenoles menos clorados (1 a 2 cloros), al parecer, el primer paso es su transformación a clorocatecoles (vía clorocatecol), la transformación del 2 y 3- clorofenol, resulta en la producción de 3-clorocatecol, mientras que el 4-clorofenol es transformado a 4-clorocatecol (Farrel y Quilty, 1999). Posteriormente, se rompe el anillo, mismo que puede ocurrir usando la vía *orto* (tipo I o tipo II) o *meta*. Sin embargo, mediante la vía *meta* se puede obtener, en ocasiones, una transformación incompleta del clorofenol, obteniéndose metabolitos inhibitorios, como el ácido 5-cloro-2-hidroxi muconico semialdehido y el ácido 5-cloroformil-2-hidroxi-penta-2,4-dienoico (Schmidt y col., 1983; Farrel y Quilty, 1999).

Esta es una desventaja que presenta la eliminación aerobia, mientras que en la eliminación anaerobia no se han reportado la formación de metabolitos inhibitorios.

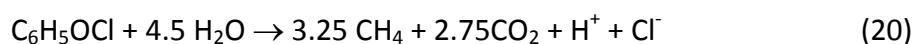
#### **1.5.4.2 Eliminación anaerobia**

##### 1.5.4.2.1 Eliminación biológica del 2-clorofenol bajo condiciones metanogénicas

La metanogénesis es la producción biológica de metano, es el paso final del flujo de carbono en muchos hábitats anaerobios (sedimentos marinos, es un ejemplo). Es llevada a cabo por un grupo de arqueas anaerobias estrictas denominadas metanógenas, las cuales tienen coenzimas exclusivas, como la coenzimas M, F<sub>420</sub>, F<sub>430</sub> y el metanofurano. Se piensa que asociaciones de organismos fermentativos y poblaciones que consumen productos de la fermentación, juegan un papel importante en la eliminación anaerobia de compuestos orgánicos clorados. Se considera que las asociaciones son esenciales para la mineralización de los compuestos orgánicos clorados en condiciones metanogénicas (Becker y col., 2005).

La mayoría de la información sobre eliminación de clorofenoles en condiciones anaerobias ha sido obtenida bajo condiciones reductoras metanogénicas. Hay evidencias que muestran que la eliminación de los clorofenoles por consorcios metanogénicos se inicia por una descloración reductiva, seguida por el rompimiento del anillo aromático y termina con la formación de metano y CO<sub>2</sub> (Boyd y col., 1984; Dietrich y Winter., 1990; Häggblom y col., 2000), siendo, al parecer, la *orto* descloración la vía más frecuente para la reducción de clorofenoles (Masunaga y col., 1996). Sin embargo, parece ser que, en condiciones metanogénicas, el primer paso de descloración reductiva permite pasar de compuestos más clorados a menos clorados, pero no siempre se oxidan hasta CO<sub>2</sub> (Woods y col. (1989); Mohn y Kennedy (1992); Monh y col. (1999); Garibay-Orijel y col., (2005)). Por ejemplo, Woods y col. (1989) observaron la deshalogenación reductiva de pentaclorofenol a diclorofenoles en un reactor UASB. Por su parte Garibay-Orijel y col. (2005), evaluaron el consumo del 2,4,6 triclorofenol en un bioreactor de lecho fluidizado

en condiciones metanogénicas obteniendo como un producto acumulado al 4-Clorofenol. En el caso particular del 2-clorofenol (2-CF), se ha propuesto que su eliminación completa involucra las siguientes etapas: descloración del 2-clorofenol a fenol, transformación del fenol a benzoato (Fig 1.5) y mineralización de benzoato a metano y CO<sub>2</sub>. Aunque también Becker y col. (1999) han propuesto otra vía posible, cuyo intermediario sería el 3-clorobenzoato (en lugar del benzoato). El 2-clorofenol parece que es el aceptor de electrones en la descloración reductiva en condiciones metanogénicas (Kuo y Genthner, 1996). La ecuación estequiométrica es:



$$\Delta G^{\circ'} = -282 \text{ kJ/reacción}$$

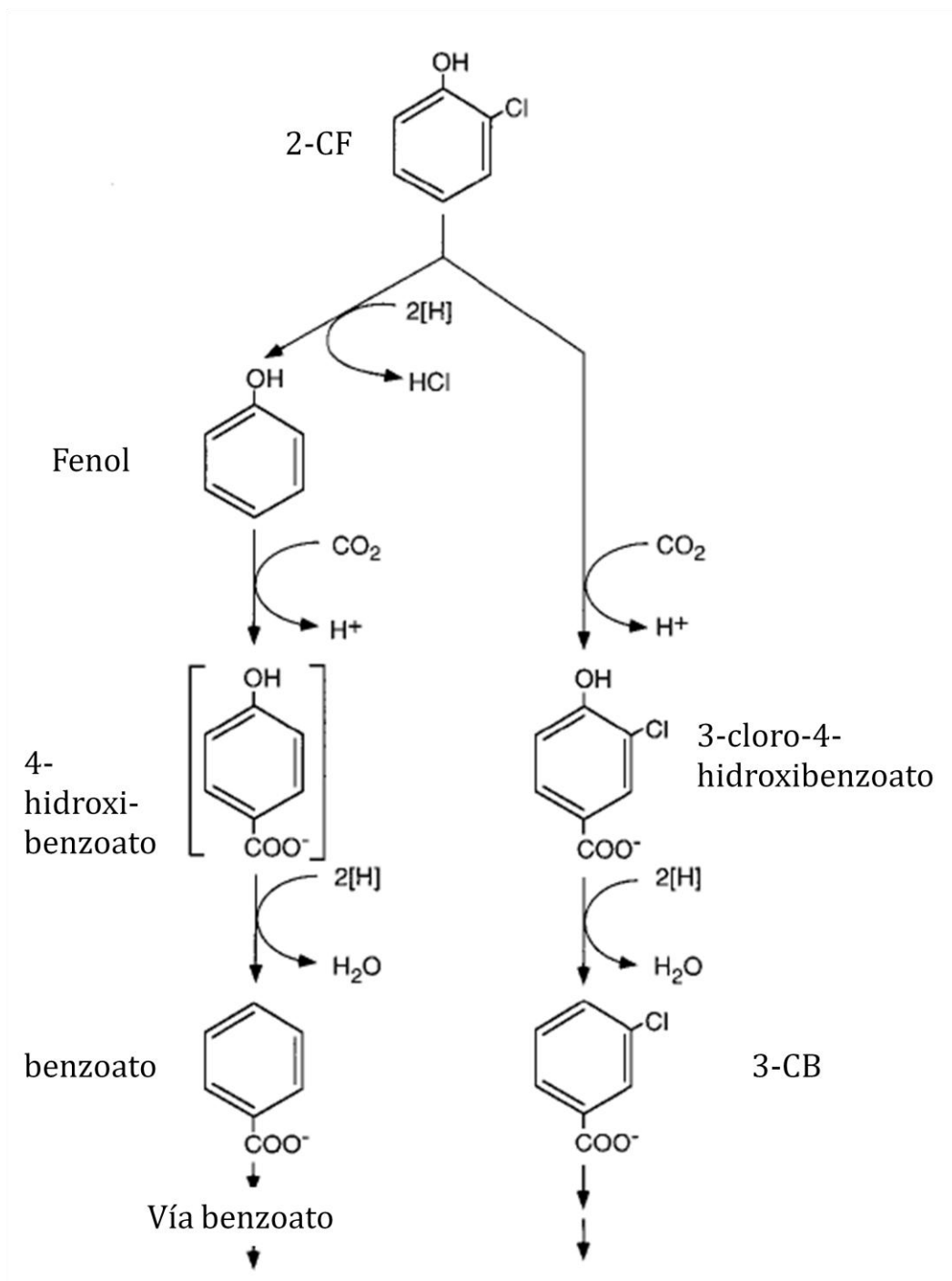
Los monoclorofenoles parecen consumirse de manera más lenta que los clorofenoles mayores, de ahí el hecho de que se acumulen como productos finales en diferentes procesos anaerobios. En la Tabla 1.5, se muestran algunas propiedades cinéticas del consumo de monoclorofenoles sobre condiciones metanogénicas. En la mayoría de los trabajos se mencionan velocidades volumétricas o específicas, pero no mencionan los rendimientos obtenidos, así no queda claro, cual fue el destino del clorofenol. Las diferencias observadas en los valores cinéticos mostrados se pueden deber a las diferentes condiciones ambientales empleadas como concentración, temperatura, pH, entre otras.

Existe poca información sobre el destino de los compuestos aromáticos clorados en condiciones reductoras diferentes a las metanogénicas. No obstante, se sabe que diversos microorganismos pueden utilizar una variedad de aceptores alternativos de electrones para la respiración, entre ellos están el nitrato, el sulfato, el manganeso y el hierro (Hägglom y col., 1993).

**Tabla 1.5** Parámetros cinéticos de la eliminación de monoclorofenoles en condiciones metanogénicas

Compuesto	Donador de electrones	de Inóculo	Sistema	Eficiencia de consumo	de Y	Velocidad	Intermediarios y/o productos	Referencia
2-CF, 3-CF y 4-CF (20 mg/L)	—	Lodo (aclimatado)	Lote	—	—	—	—	Boyd y Shelton (1984)
2-CF	Ext. de levadura, peptona y butirato	Cultivo mixto (aclimatado 1 año)	Lote	—	—	180 mg/L d	Fenol acumulado	Dietrich y Winter (1990)
2-CF (2000 mg/L)	Ext. de levadura y peptona	Cultivo mixto (aclimatado 1 año)	Cultivo continuo <sup>1</sup>	—	—	375 mg/L d	Fenol (acumulacion), CH <sub>4</sub> , CO <sub>2</sub> , HCl	Dietrich y Winter (1990)
2-CF (12.85 mg/L)	—	Sedimento	Lote	—	—	4.11mg/Ld	Fenol, CH <sub>4</sub>	Hägglom y col. (1993)
2-CF (25.75 mg /L)	—	Sedimento	Lote	—	—	—	Fenol.benzoato y 3-clorobenzoato (acumulación)	Becker y col. (1999)
4-CF (200 mg/L)	Acido acético	Lodo	Lote	—	—	6.4 <sup>4</sup>	-	Vallecillo y col.(1999)
2-CF (25 mg/L)	H <sub>2</sub>	Biofilm hidrogenotrofo (aclimatado 2 meses)	Cultivo continuo <sup>2</sup>	95%	—	—	Fenol	Chang y col. (2004)
2-CF	—	Lodo (aclimatado)	Lote	—	—	0.08 mg /Ld aprox.	—	Ye y Shen (2004)
2-CF	Sacarosa	Lodo (aclimatado)	Lote	—	—	0.38 mg /Ld aprox.	—	Ye y Shen (2004)
2-CF (48.9 mg/L)	Extracto levadura	de Lodo	Lote	—	—	—	Fenol, benzoato	Basu y col. (2005)
2-CF ( 30 mg/L)	Acetato	Lodo (aclimatación 190 d)	Cultivo continuo <sup>3</sup>	93- 96.6%	—	5.54 <sup>5</sup>	Cl <sup>-</sup> , AGVs	Majumder y Gupta (2007)
2-CF (250- 2600 mg/L)	Extracto de levadura y peptona	Lodo (aclimatado 3 semanas)	Cultivo continuo <sup>1</sup>	54-80 % aprox.	—	0.873 (máxima) g/L d	—	Bajaj y col. (2008)
2-CF (50 mg /L)	—	Lodo	Lote	87.14 %	0.84 <sup>4</sup>	0.0014 <sup>5</sup>	Fenol, CH <sub>4</sub>	Beristain-Montiel y col. (2010)
2-CF (50 mg /L)	—	Lodo (aclimatado 80 d)	Lote	84.8 %	0.88 <sup>4</sup>	0.003 <sup>5</sup>	Fenol, CH <sub>4</sub>	Beristain-Montiel y col. (2010)
2-CF (50 mg/L)	Acetato	Lodo (aclimatado 80 d)	Lote	83.7 %	0.79 <sup>4</sup>	0.0028 <sup>5</sup>	Fenol, CH <sub>4</sub>	Beristain-Montiel y col. (2010)
2-CF(50 mg /L)	Fenol	Lodo (aclimatado 80 d)	Lote	100 %	0.66 <sup>4</sup>	0.0044 <sup>5</sup>	Fenol, CH <sub>4</sub>	Beristain-Montiel y col. (2010)
4-CF	—	—	—	—	—	—	Fenol, benzoato	Itoh y col.(2011)

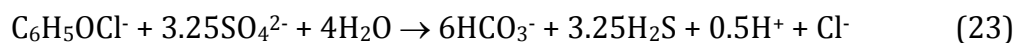
1, AFBR = Reactor de cama fija anaerobio (anaerobic fixed bed reactor); 2, SMBR = bioreactor membrana silicon (silicone membrana bioreactor); 3, UASB = Reactor anaerobio de cama de lodos de flujo ascendente; 4, Rendimiento (formación de C de biogás/ C consumido de clorofenol); 5, Velocidad específica de consumo (mg C-clorofenol / g SSV d)



**Figura 1.5.** Vía propuesta para la transformación del 2-clorofenol en condiciones anaerobias (Becker y col., 1999).

#### 1.5.4.2.2 Eliminación biológica del 2-clorofenol bajo condiciones sulfato reductoras

El sulfato y varios compuestos inorgánicos de azufre pueden ser aceptores de electrones en la respiración anaerobia. El H<sub>2</sub>S es el producto final de la reducción del sulfato y es realizado por las bacterias sulfato reductoras, que constituyen un grupo ampliamente distribuido en la naturaleza. En condiciones sulfato reductoras se ha mencionado que pueden ocurrir dos cosas. En primer lugar el sulfato u otros óxidos de sulfuro pueden tomar el lugar del 2-clorofenol e inhibir parcial o totalmente la descloración (DeWeerd. K., y col., 1991; Chang y col., 2004), ó bien, en algunos casos, se puede realizar la descloración en presencia de sulfato. En esta condición, la sulfato reducción y la descloración pueden proceder simultáneamente (Kennes y col., 1996; Häggblom M., 1998). Häggblom (1998) encontró que el 4-clorofenol es desclorado reductivamente a fenol bajo condiciones sulfato reductoras y la mineralización del fenol a CO<sub>2</sub> se acopla a la sulfato reducción en presencia de 3-fluorofenol. Sin embargo, García-Cruz y col. (2010) observaron que, una concentración de 600 mg/L de 4-CF en presencia de etanol, ocasiona el cese completo de la sulfato reducción y de la transformación de etanol. En la Tabla 1.6 se muestran algunas variables de respuestas obtenidas en estudios realizados en condiciones sulfato reductoras, se puede observar que faltan datos de velocidades, eficiencias de consumo y rendimientos de formación de productos que nos ayuden a entender mejor el proceso. La ecuación estequiométrica del consumo de 2-CF en condiciones sulfato reductoras, es la siguiente:



$$\Delta G^{\circ'} = -344 \text{ kJ/reacción}$$

**Tabla 1.6** Parámetros cinéticos de la eliminación de monoclorofenoles en condiciones sulfato reductoras

Compuesto	Donador de electrones (cosustrato)	Inóculo	Sistema	Eficiencia	Y	Velocidad	Intermediarios y/o productos	Referencia
2-CF (12.85 mg/L)	—	Sedimento aclimatado (más de 120 d)	Lote	—	—	1.28 mg/Ld	—	Häggbloom y Young (1990)
3-CF (12.85 mg/L)	—	Sedimento aclimatado (más de 120 d)	Lote	—	—	1.92 mg/Ld	—	Häggbloom y Young (1990)
4-CF (12.85 mg/L)	—	Sedimento aclimatado (más de 120 d)	Lote	—	—	4.75 mg/Ld	—	Häggbloom y Young (1990)
2-CF	—	Sedimento (aclimatado)	Ensayos en lote	—	—	1.079 mg/Ld	—	Häggbloom y col. (1993)
4-CP (25.7 mg/L)	—	Cultivo enriquecido (aclimatado 5 años)	Lote	—	—	—	—	Häggbloom y col. (1995)
4-CF	2-fluorofenol	Consorcio enriquecido	Lote	—	—	—	Fenol, 2 fluorofenol	Häggbloom (1998)
2-CF (25 mg/L)	H <sub>2</sub>	Biofilm hidrogenotrofo (aclimatado 4 meses)	Lote	—	—	—	Fenol, sulfato <sup>2</sup>	Chang y col. (2003)
2-CF (25 mg/L)	H <sub>2</sub>	Biofilm hidrogenotrofo (aclimatado 2 meses)	Cultivo continuo <sup>1</sup>	94%	—	—	Fenol	Chang y col. (2004)

1 Bioreactor membrana silicon

2 El sulfato no se consumió (ocurrió un descloración en presencia de sulfato)

#### 1.5.4.2.3 Eliminación biológica del 2-clorofenol bajo condiciones desnitrificantes

La mineralización de los clorofenoles acoplada a la desnitrificación está escasamente documentada, además, frecuentemente se puede confundir al proceso desnitrificante con el simple consumo de nitrato sin verificar la reducción total del nitrato hasta  $N_2$ . En la Tabla 1.7 se presentan algunos estudios donde se reporta el consumo del 2-CF bajo condiciones desnitrificantes. Los trabajos presentados en la Tabla 1.7 omiten datos cinéticos, así como datos de rendimiento de formación de producto (que podría indicar cual fue el metabolismo predominante), o inclusive las eficiencias de consumo del 2-CF son escasamente mencionadas. Por lo anterior es necesario realizar más estudios que evalúen el proceso a través de las variables de respuestas como rendimientos de formación de producto, velocidades y eficiencias con el fin de caracterizar y/o entender mejor el proceso.

Häggbloom y col. (1993) estudiaron la eliminación de tres monoclorofenoles en cultivo en lote bajo condiciones desnitrificantes. Sólo fue eliminado el 2-clorofenol en 110 días y a diferencia de los otros procesos respiratorios, no detectaron la formación de fenol como producto de la descloración reductiva. Por su parte, Bae y col. (2002) también estudiaron la eliminación de monoclorofenoles y diclorofenoles bajo condiciones desnitrificantes en cultivos en lote, encontrando que el 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol y el 2,6-diclorofenol no fueron eliminados, mientras que el 2-clorofenol y el 3-clorofenol sí lo fueron. Esta capacidad metabólica del lodo sólo fue sostenida por el 2-clorofenol en una resiembra, pero no en la siguiente. No obstante, señalaron que el 2-clorofenol fue oxidado hasta  $CO_2$  en condiciones desnitrificantes y sugieren la presencia de una población capaz de eliminar el 2-clorofenol por un mecanismo que no involucra la descloración reductiva. Sin embargo, no midieron intermediarios carbonados ni la producción de  $N_2$  que evidenciara que la desnitrificación se llevó a cabo, por lo cual, no es posible entender con precisión lo que ocurrió en este trabajo.



**Tabla 1.7.** Parámetros cinéticos de la eliminación de monoclorofenoles en condiciones desnitrificantes.

Compuesto	Donador de electrones (cosustrato)	Inóculo	Sistema	Eficiencia	Y	Velocidad	Intermediarios	Referencia
2-CF,3-CF o 4-CF (12..85 mg/L)	—	Sedimento	Lote	—	—	—	—	Hägglom y col. (1993)
2-CF, 3-CF o 4-CF (25.75 mg/L)	Acetato o mezcla de ácidos grasos volátiles.	Suelo	Lote	—	—	—	Fenol, benzoato	Sanford y col. (1997)
4-CF (642.8mg / L)	—	Microorganismos enriquecidos (aclimatados)		—	—	—	Cl <sup>-</sup>	Jianlong y col. (2001)
2-CF (12.8 mg/L)	Na <sub>2</sub> S.9H <sub>2</sub> O	Lodo aclimatado (enriquecido)	Lote	—	—	—	—	Bae y col., 2002
2-CF (25 mg/L)	H <sub>2</sub>	Biofilm hidrogenotrofo (aclimatado meses)	Lote 4	—	—	—	Fenol <sup>2</sup>	Chang y col. (2003)
2-CF(25 mg /L)	H <sub>2</sub>	Biofilm hidrogenotrofo (aclimatado meses)	Cultivo continuo <sup>1</sup> 2	95%	—	—	Fenol	Chang y col. (2004)

1 Bioreactor membrana silicón

2 El fenol fue producido después de la desaparición del nitrato

Por su parte, Chang y col. (2003) utilizaron una biopelícula para eliminar el 2-clorofenol en condiciones desnitrificantes en cultivo en lote. Observaron que el nitrato desapareció en 16 h y, al mismo tiempo, hubo un consumo del 2-clorofenol, pero no hubo formación de fenol en este periodo. El fenol fue producido sólo después de la desaparición del nitrato, por lo que sugieren que el 2-clorofenol no fue desclorado en presencia de nitrato, pero no mencionan a través de que proceso se consumió el 2-CF. Chang y col. (2004) utilizando un biofilm hidrogenotrofo y con una corriente de 20 ml de  $H_2$ /min, encontraron que es posible eliminar 40 mg de 2-clorofenol/Ld con un 95% de eficiencia, pero no se aportaron evidencias que mostraran que el nitrato fuera reducido a  $N_2$ . También observaron un consumo de 2-CF en ausencia de  $H_2$  por lo que sugieren que fue posiblemente otra vía la responsable de la desaparición del 2-clorofenol durante este periodo. Como se puede observar la información es escasa y todavía no está claro a través de que vía metabólica se lleva a cabo el consumo del 2-CF en condiciones desnitrificantes.

### **1.5.5 Estrategias para incrementar el consumo del 2-CF**

Se ha señalado que la principal dificultad para la eliminación de los clorofenoles es la fuerte estabilidad que el enlace carbono-halógeno del compuesto aromático le confiere a su estructura (Farrel and Quilty, 2002). De acuerdo con esto, se han propuesto algunas estrategias para incrementar la eficiencia de eliminación y/o velocidad de su consumo. Entre ellas, la adaptación al contaminante, el uso de microorganismos modificados genéticamente y la adición de fuentes alternas de carbono (Fakhruddin y Quilty, 2005). También se ha sugerido que la adición de fuentes de carbono de fácil oxidación podría ejercer varios efectos, tales como la disminución de la toxicidad, actuando como un agente inductor de enzimas o proporcionando poder reductor para el consumo de compuestos orgánicos recalcitrantes (Perkins et al., 1994; Chaudhuri y Wiesmann de 1995; Martínez-Hernández et al., 2009).

Los estudios sobre la influencia de donadores de electrones en la eliminación del 2-CF sobre condiciones desnitrificantes son escasos. Sanford and Tiedje, (1997), evaluaron en botellas serológicas, la eliminación del 2-CF en presencia de nitrato y acetato. Observaron que el consumo de 2-CF fue inhibido por la presencia de nitrato y solo se llevó a cabo cuando el nitrato desapareció o se encontró en concentraciones menores que 104 mg/L. Sin embargo, encontraron que el 2-CF fue desclorado a fenol, sugiriendo que este compuesto fue un aceptor de electrones.

El empleo de sustratos como donadores de electrones y/o cosustratos en el consumo de clorofenoles ha sido más ampliamente estudiado en condiciones aerobias que en anaerobias. En la Tabla 1.8 se muestran algunos estudios de monoclorofenoles en presencia de donadores de electrones y/o cosustratos en condiciones aerobias, se puede observar que los sustratos utilizados como donadores de electrones incluyen compuestos de fácil oxidación y compuestos con una estructura similar al clorofenol. De manera general se puede decir que en la mayoría de los casos, la utilización de estos sustratos puede incrementar la eficiencia de eliminación y/o su velocidad de consumo. Sin embargo, no todos los datos pueden ser comparables entre si, debido a que el tipo de inóculo y las condiciones fueron diferentes. Tanto en condiciones aerobias como anaerobias hace falta una mejor comprensión del efecto de la adición de donadores de electrones sobre el consumo del 2-CF evaluado a través de variables de respuesta, tales como: velocidades, eficiencias y rendimientos, que nos permitan entender y generar conocimiento.

**Tabla 1.8** Parámetros cinéticos de la eliminación de monoclorofenoles en condiciones aerobias

Compuesto	Donador de electrones (cosustrato)	Inóculo	Sistema	Eficiencia	Y	Velocidad	Intermediarios y/o productos	Referencia
4-CF (100 mg/L)	Fenol	<i>Pseudomonas putida</i>	Lote	—	—	45 mg/Lh	—	Loh y Wang (1998)
4-CF (100 mg/L)	Fenol, glutamato de sodio.	<i>Pseudomonas putida</i>	Lote	—	—	60 mg/Lh	—	Loh y Wang (1998)
4-CF (100 mg/L)	Fenol, glucosa	<i>Pseudomonas putida</i>	Lote	—	—	69 mg /Lh	—	Loh y Wang (1998)
4-CF (30 mg/L)	Glucosa	<i>Pseudomonas putida</i>	Lote	—	$Y_{x/s} = 0.52$	—	—	Tarighian y col. (2003)
2-CF (20 mg/L)	Fenol	<i>Burkholderia tropicalis</i>	Lote	75.9%	$Y_{x/s} = 0.027$	—	Acumulación de un producto desconocido	De los Cobos-Vasconcelos y col. (2006)
4-CF (20 mg/L)	Fenol	<i>Burkholderia tropicalis</i>	Lote	100%	$Y_{x/s} = 0.038$	—	—	De los Cobos-Vasconcelos y col. (2006)
4-CF (50mg/L)	Glucosa	Cultivo mixto	Lote	16%	—	—	—	Lee y Lee (2007)
4-CF (50 mg/L)	Fenol	Cultivo mixto	Lote	—	—	—	—	Lee y Lee (2007)
4-CF (105-2100 mg/L)	Fenol	Lodo aclimatado (2 meses)	Lote <sup>1</sup>	—	—	9.9 <sup>3</sup> (máxima)	4-clorocatecol	Monsalvo y col. (2009)
4-CF (20-40 mg/L)	Fenol. glucosa	<i>Comamonas testosteroni</i>	Lote	—	—	—	—	Tobajas y col. (2012)
4-CF (50mg/L)	Acetate	Lodo	Lote <sup>2</sup>	100%	—	4.65 <sup>3</sup>	—	Carucci y col. (2010)
4-CF (50mg/L)	Acetate	Lodo	Lote <sup>1</sup>	100%	—	6.91-16.17 <sup>3</sup>	—	Carucci y col. (2010)
2-CF	Glucosa	Cultivo mixto	Lote <sup>1</sup>	94% <sup>4</sup>	—	—	—	Khan y col. (2011)

1, SBR = Reactor de lotes secuenciados, 2, GSBR = Reactor granular de lotes secuenciados, 3, mg 4-CF/g SSV h, 4, En términos de COD y no de 2-CF

## 1.6 Bibliografía

- Abeling, A. C. and Seyfried, C. F. (1992). Anaerobic-aerobic treatment of high strength ammonium wastewater – nitrogen removal via nitrite. *Wat. Sci. Tech.* **26** (5-6), 1007-1015.
- Adav, S.S., Lee, D.-J., Lee, Lai, J.Y. (2010). Enhanced biological denitrification of high concentration of nitrite with supplementary carbon source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 773-778.
- Ahn, Y.-H. (2006). Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry.* **41**, 1709-1721.
- Akunna, J.C., Bizeau, C., Moletta, R. (1993). Nitrate and nitrite reductions with anaerobic sludge using various carbon sources: glucose, glycerol, acetic acid, lactic acid and methanol. *Wat. Res.* **27**, 1303-1312.
- Akunna, J.C., Bizeau, C. and Molleta, R. (1994). Nitrate reduction by anaerobic sludge using glucose at various nitrate concentrations: ammonification, denitrification and methanogenic activities. *Environ. Technol.* **15**, 41-49
- Allard, A., Häggblom, M., Oppenheimer, R., Young, L. (1992) Role of sulfate concentration in dechlorination of 3, 4,5-trichlorocatechol by stable enrichment cultures grown with coumarin and flavanone glycones and aglycones. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 961-968.
- Almeida, J.S., Júlio, S.M., Reis, M.A.M., Corrondo, J.T. (1995). Nitrite inhibition of denitrification by *Pseudomonas fluorescens*. *Biotechnol. Bioeng.* **46**, 194-201.
- Bae, H., Yamagishi, T., Suwa, Y. (2002). Evidence for degradation of 2-chlorophenol by enrichment cultures under denitrifying conditions. *Microbiology.* **148**, 221-227

- Bae, H., Yamagishi, T., Suwa, Y. (2003). Developing and sustaining 3-chlorophenol-degrading populations in up-flow anaerobic column reactors under circum-denitrifying conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 118-124.
- Bailey, L.D., Beauchamp, E.G (1973). Effects of temperature on  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NO}_2^-$  reduction nitrogenous gas production, and redox potential in saturated soil. *Can. J. Soil Sci.* **53**, 213-218.
- Bailey, L.D. (1976). Effects of temperature and root on denitrification in a soil. *Can. J. Soil Sci.* **56**, 79-87.
- Bajaj, M., Gallert, C., Winter, J. (2008). Anaerobic biodegradation of high strength 2-chlorophenol-containing synthetic wastewater in fixed bed reactor. *Chemosphere.* **73**, 705-710.
- Baker, S.C., Ferguson, S.J., Ludwig, B., Page, M. D., Richter, O.-M. H., and van Spanning, R.J.M (1998). Molecular genetics of the genus *Paracoccus*: metabolically versatile bacteria with bioenergetic flexibility. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1046-1078.
- Bal, A.S.; Dhagat, N.N. (2001). Upflow anaerobic sludge blanket reactor a review. *Indian J. Environ Health.* **43**(2), 1-82.
- Bandara, J., Mielczarski, J.A., Kiwi, J. (2001). Adsorption mechanism of chlorophenols on iron oxides, titanium oxide and aluminum oxide as detected by infrared spectroscopy. *Appl. Catal. B.* **34**, 307-320.
- Basu, S.K., Oleszkiewicz, J.A., Sparling, J. (2005). Effect of sulfidogenic and methanogenic inhibitors on reductive dehalogenation of 2-chlorophenol. *Environ. Technol.* **26**, 1383-1392
- Becker, J.G., Stahl, D. A., Rittmann, B.E.(1999). Reductive dehalogenation and Conversion of 2-chlorophenol to 3-chlorobenzoate in methanogenic sediment community:

- implications for predicting the environmental fate of chlorinated pollutants. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5169-5172.
- Becker, G., Berardesco, G., Rittmann, B., Stahl, D. (2005). The role of syntrophic associations in sustaining anaerobic mineralization of chlorinated organic Compounds. *Environmental Health Perspectives.* **113**, 310-316.
- Becker, G., Berardesco, G., Rittmann, B., Stahl, D. (2006) Effects of endogenous substrate on adaptation of anaerobic microbial communities to 3-chlorobenzoate. *Appl. Environ. Microbiol.* **72** (1), 449-456.
- Bedzyck, L., Wang, T., Ye, R.W. (1999). The periplasmatic nitrate reductase in *Pseudomonas* sp. Strain G-179 catalyzes the first step of denitrification. *J. Bacteriol.* **181**, 2802-2806.
- Bell, L.C., Richardson, D.J., and Ferguson, S.J. (1990). Periplasmic and membrane-bound respiratory nitrate reductase in *Thiosphaera panthotropa*. *FEBS Lett.* **265**, 85-87.
- Beristain-Cardoso, R., Texier, A.-C., Sierra-Alvaréz, Field, J.A., Razo-Flores, E., Gómez, J. (2008). Simultaneous sulfide and acetate oxidation under denitrifying conditions using an inverse fluidized bed reactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **83**, 1197-1203.
- Beristain-Cardoso, R., Texier, A., Sierra-Àlvarez, R., Razo-Flores, E., Field, J., Gómez, J. (2009). Effect of initial sulfide concentration on sulfide and phenol oxidation under denitrifying conditions. *Chemosphere.* **74**, 200-205.
- Beristain-Montiel, L., Gómez-Hernández, J., Monroy-Hermosillo, O., Cuervo-López, F., Ramírez-Vives, F. (2010). Methanization and mineralization of 2-chlorophenol by anaerobic digestion *Wat. Sci. Technol.* **62**, 1791-1798.

- Berks, B.C., Baratta, D., Richardson, D.J., Ferguson, S.J. (1993). Purification and characterization of a nitrous oxide reductase from *Thiosphaera pantotropha*. *Eur. J. Biochem.* **212**, 467-476)
- Berks, B.C., Richardson, D.J., Robinson, C., Reilly, A., Aplin, R.T. and Ferguson S.J. (1994). Purification and characterization of the periplasmic nitrate reductase from *Thiosphaera panthotropha*. *Eur. J. Biochem.* **220**, 117-124.
- Berks, B.C. Ferguson, S.J., Moir, J.W.B., Richardson, D.J. (1995). Enzymes and associated electron transport systems that catalyze the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochem. Biophys. Acta.* **1232**, 97-173.
- Betlach, M.R., Tiedje, J.M. (1981). Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide during bacterial denitrification. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 1074-1084.
- Bing-Jie,N., Han-Qing, Y. (2008). Storage and Growth of denitrifiers in aerobic granules: par I. model development. *Biotechnol. Bioeng.* **99**, 314-323.
- Blackmer, A. M., Bremner, J.M. (1978). Inhibitory effect of nitrate on reduction of N<sub>2</sub>O to N<sub>2</sub> by soil microorganisms. *Soil. Biol. Biochem.* **10**, 187-191.
- Blüme, S., Zumft, W.G. (1990). Respiratory nitrate reductase from denitrifying *Pseudomonas stutzeri*, purification, properties and target of proteolysis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1057**, 102-108.
- Boller, M., Gujer, W.(1986). Nitrification in tertiary trickling filters followed by deep-bed filters. *Water Res.* **20**, 1363-1373.
- Bossert, I.D., Young, L.Y. (1986). Anaerobic oxidation of p-cresol by a denitrifying bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 1117-1122.
- Boule, P., Othmen, K., Richard, C., Szczepanik, B., Grabner, G. (1999). Phototransformation of halogenoaromatic derivatives in aqueous solution. *Int. J. Photoenergy.* **1**, 1-6.



- Boyd, S. and Shelton, D. (1984). Anaerobic biodegradation of chlorophenols in fresh and acclimated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 272-277
- Bradberry, S. M., Proudfoot, A.L., Vale, J.A. (2004). Poisoning due to chlorophenoxy herbicides. *Toxicological Reviews.* **23**, 65-73.
- Broda, E. (1977). Two kinds of lithotrophs missing in nature. *Z. Allg. Mikrobiol.* **17**, 123-143.
- Braker, G., Fesefeldt, A., Witzel, K. P. (1998). Development of PCR primer system for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3769-3775.
- Buitrón, G., Moreno-Andrade, I. (2010). Biodegradation kinetics of a mixture of phenols in a sequencing batch moving bed biofilm reactor under starvation and shock loads. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **86**, 669-674.
- Burland, S.M., Edwards, E. (1999). Anaerobic benzene biodegradation linked to nitrate reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 529-533.
- Cabello, P., Roldán, M. D. and Moreno-Vivián, C. (2004). Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. *Microbiology* **150**, 3527-3546.
- Carlson, C.A., Ferguson, L.P., Ingraham, J.L. (1982). Properties of dissimilatory nitrate reductase purified from the denitrifier *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **151**, 162-171.
- Carucci, A., Milia, S., Cappai, G., Muntoni, A. (2010). A direct comparison amongst different technologies (aerobic granular sludge, SBR and MBR) for the treatment of wastewater contaminated by 4-chlorophenol. *J. Hazard. Mater.* **177**, 1119-1125.
- Carr, G.C., Ferguson, S.J. (1990). The nitric oxide reductase of *Paracoccus denitrificans*. *Biochem. J.* **269**, 423-429.

- Cervantes, F., Monroy, O., Gomez, J. (1998). Accumulation of intermediates in a denitrifying process at different copper and high nitrate concentrations. *Biotechnol. Lett.* **20**, 959-961.
- Cervantes-Carrillo, F., Pérez, J., Gómez, J. (2000). Avances en la eliminación biológica del nitrógeno de las aguas residuales. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **42**, 73-82.
- Cervantes, F., Meza-Escalante, E., Texier, A.-C., Gómez, J. (2009). Kinetic limitations during the simultaneous removal of *p*-cresol and sulfide in a denitrifying process, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 1417-1424.
- Cervantes, F. J. (2009). Anthropogenic sources of N-pollutants and their impact on the environment and on public health. In *Environmental technologies to treat nitrogen pollution*, pp. 52. Edited by IWA publishing London-New York. Pp5
- Chang, C., Tseng, S., Chang, Chih., Ho, C. (2003). Reductive dechlorination of 2-chlorophenol in a hydrogenotrophic, gas permeable, silicone membrane reactor. *Bioresource Technology.* **90**, 323-328
- Chang, C., Tseng, S., Chang, Chih., Ho, C. (2004). Degradation of 2-chlorophenol via a hydrogenotrophic biofilm under different reductive conditions. *Chemosphere.* **56**, 989-997.
- Chaudhuri B., Wiesmann U. (1995) Enhanced anaerobic degradation of benzene by enrichment of mixed microbial culture and optimization of the culture medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 178-187.
- Chiou, C.T., Schmedding, D.W., Manes, M. (2005). Improved prediction of octanol-water partition coefficients from liquid-solute water solubilities and molar volumes. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 8840-8846.
- CNA (2010). Comisión Nacional del Agua. Estadísticas del agua en México, Edición 2010. Editorial: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. pp 21-22 y 110.

- Coyle, C.L., Zumft, W.G., Kroneck, M.H., Körner, H., Wolfgang, J. (1985). Nitrous oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas perfectomarina*: purification and properties of a novel multicopper enzyme. *Eur. J. Biochem.* **153**, 459-457.
- Coyne, M.S., Arunakumari, A., Pankratz, H.S., Tiedje, J.M. (1989). Localization of cytochrome cd1 and copper nitrite reductase in denitrifying bacteria. *J. Bacteriol.* **172**, 2558-2562.
- Craske A., Ferguson, S.J. (1986). The respiratory nitrate reductase from *Paracoccus denitrificans*: molecular characterization and kinetic properties. *Eur. J. Biochem.* **158**, 429-436.
- Cuervo-López, F. M., Martínez, F., Gutiérrez, M., Noyola, R. A. and Gómez, J. (1999). Effect of nitrogen loading rate and carbon source on denitrification and sludge settleability in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Wat. Sci. Tech.* **40**, 123-130.
- Cuervo-López, F., Martínez-Hernández, S., Texier, A.-C., and Gómez, J.(2009) Principles of denitrifying processes. In *Environmental technologies to treat nitrogen pollution*, pp. 52. Edited by IWA publishing London-New York.
- Davies, K. J. P., Lloyd, D. and Boddy, L. (1989). The effect of oxygen on Denitrification in *Paracoccus denitrificans* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **135**, 2445-2451.
- Denariáz, G., Payne, W.J., LeGall, J. (1991). The denitrifying nitrite reductase of *Bacillus halodenitrificans*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1056**, 225-232.
- De los Cobos-Vasconcelos, D., Santoyo-Tepole, F., Juárez-Ramírez, C., Ruíz-Ordaz, C.J.J. Galíndez-Mayer. (2006). Cometabolic degradation of chlorophenols by a strain of *Burkholderia* in fed-batch cultura. *Enzyme and Microb. Technol.* **40**, 57-60.

- DeWeerd, K., Concannon, F., Suflita, J. (1991) relationship between hydrogen consumption, dehalogenation, and the reduction of sulfur oxyanions by *Desulfomonile tiedjei*. *Appl. Environ Microbiol.* **57**, 1929-1934.
- Dietrich, G., and Winter J. (1990). Anaerobic degradation of chlorophenol by an enrichment culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 253-258.
- Dobbie, K.E., Smith, K.A. (2001). The effects of temperature, water-filled pore space and land use on N<sub>2</sub>O emissions from an imperfectly drained gleysol. *European J. Soil Sci.* **52**, 667-673.
- Elefsiniotis, P., Li, D. (2006). The effect of temperature and carbon source on denitrification using volatile fatty acids. *Biochemical Engineering Journal.* **28**, 148-155.
- Ellington, M.J.K., Foddike, W.L.J., Sawers, R.G., Richardson, D.J., Ferguson, S.J. (2006). Regulation of the *nap* operon encoding the periplasmic nitrate reductase of *Paracoccus pantotrophus*: delineation of AND sequences required for redox control. *Arch. Microbiol.* **184**, 298-304.
- EPA (2003). National primary drinking water standards. Environmental Protection Agency (EPA 816-F-03-016).
- Evans, P.J., Mang, D.T., Kim, K.S., Young, Y. (1991). Anaerobic degradation of toluene by denitrifying bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1139-1145.
- Exon, J.H. and Koller, L.D. (1982). Effects of transplacental exposure to chlorinated phenols. *Environ. Health Perspect.* **46**, 137-140
- Fakhruddin A. and Quilty B. (2005) The influence of glucose and fructose on degradation of 2-chlorophenol by *Pseudomonas putida* CP1. *World Journal of Microbiol. and Biotechnol.* **21**, 1541-1548.

- Fan, A. M. and Steinberg, V. E. (1996). Health implications of nitrate and nitrite in drinking water: an update on methemoglobinemia occurrence and reproductive and developmental toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. **23**, 35-43
- Farrel, A. and Quilty B. (2002). The enhancement of 2-chlorophenol degradation by a mixed microbial community when augmented with *Pseudomonas putida* CP1. *Water Res.* **36**, 2443-2450.
- Ferguson, S.J. (1987). Denitrification: a question of the control and organization of electron and ion transport. *TIBS*. **12**, 354-357.
- Ferguson, S.J. (1994). Denitrification and its control. *Antonie van Leeuwenhoek*. **66**, 89-110.
- Fernández-Nava, Y., Marañón, E., Soons, J., Castrillón, L. (2008). Denitrification of wastewater containing high nitrate and calcium concentrations. *Bioresorce Technology*. **99**, 7976-7981.
- Fetzner, S. (1998) Bacterial dehalogenation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 633-657.
- Finkel' shtein, Z.I., Baskunov, B.P., Golovleva, L.A. (2000). Dependence of the conversion of chlorophenols by rhodococci on the number and position of chlorine atoms in the aromatic ring. *Microbiology*. **69**, 40-47.
- Forman, D. (1991). Nitrate exposure and human cancer. In: Bogardi, I., Kuzelka, R.(eds.) Nitrate Contamination, RD NATO ASI Series. G30 Springer-Verlag.
- Fujiwara, T., Fukumori, Y. (1996). Cytochrome cb-type nitric oxide reductase with cytochrome c oxidase activity from *Paracoccus denitrificans* ATCC 35512. *J. Bacteriol.* **178**, 1866-1871.
- Galloway, J.N., Townsend, A.R., Erisman, J.W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J.R., Martinelli, L. A., Seitzinger, S. P., Sutton, M.A. (2008). Transformation of nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science*. **320**, 889-892.

- Garibay-Orijel, C., Ríos-Leal, E., García-Mena, J., Poggui-Varaldo, M. (2005). 2,4,6-Trichlorophenol and phenol removal in methanogenic and partially-aerated methanogenic conditions in fluidized bed bioreactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **80**, 1180-1187.
- Gerardi, M. H. (2002). Wastewater Microbiology: nitrification and denitrification in the activated sludge process. Ed Wiley- Interscience pp 4
- Ginige, M.P., Keller, J., Blackall, L.L. (2005). Investigation of an acetate-fed denitrifying microbial community by stable isotope probing, full-cycle rRNA analysis, and fluorescent in situ hybridization-microautoradiography. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8683-8691.
- Glass, C., Silverstein, J., Oh, J. (1997). Inhibition of denitrification in activated sludge by nitrite. *Water Environ. Res.* **69**, 1086-1093.
- Godden, J.W., Turley, S., Teller, D.C., Adman, M.Y. E.T., Liu, M.Y., Payne, W.G., LeGall, J. (1991). The 2.3 Angstrom X-ray structure of nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes*. *Science.* **253**, 438-442.
- Gómez, J., Méndez, R. and Lema, J. (1996). The effects of antibiotics on nitrification process: Batch assays. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **57**, 869-876.
- Gregus, Z. and Klaassen, C.D. (2001). Mechanisms of toxicity. In Klaassen, C.D. (editor). Casarett and Doull's toxicology, sexta edición. New York: McGraw-Hill. 35-81.
- Gudat, G.C., Singh, J., Wharton, D.C. (1973). Cytochrome oxidase from *Pseudomonas aeruginosa*. Purification and some properties. *Biochim. Biophys. Acta.* **292**, 376-390.
- Hägglom, M.M., Young, L. Y. (1990). Chlorophenol degradation coupled to sulfate reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 3255-3260.

- Häggbloom., Rivera, M., Young, L. (1993) Influence of alternative electron acceptors on anaerobic biodegradability of chlorinated phenols and benzoic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1162-1167.
- Häggbloom, M. (1998). Reductive dechlorination of halogenated phenols by a sulfate-reducing consortium. *FEMS Microbiology Ecology.* **26**, 35-41.
- Häggbloom, M. M., Knight, V. K., L. J. Kerkhof (2000). Anaerobic decomposition of halogenated aromatic compounds. *Environmental Pollution.* **107**, 199-207.
- Häggbloom, M. M., Bossert, I. D. (2003). Halogenated organic compounds – a global perspective. In Dehalogenation microbial processes and environmental applications. pp. 3. Edited by Kluwer Academic Publishers , USA.
- Hayatsu, M., Tago, K. and Saito, M. (2008). Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition* **54**, 33-45.
- Heiss, B., Frunzke, K., Zumft, W. (1989). Formation of the N-N bond from nitric oxide by a Membrane-Bound Cytochrome *bc* complex of nitrate-respiring (denitrifying) *Pseudomonas stutzeri*. *J. Bacteriol.* **171**, 3288-3297.
- Hellinga, C., Schellen, A.A.J.C., Mulder, J.W., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1998). The Sharon process: An innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water. *Wat. Sci. Technol.* **37**, 135-142.
- Henry, S., Bru, D., Stres B., Hallet, S., Philippot, L. (2006). Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5181-5189.

- Hellinga C., Schellen A.A.J.C., Mulder J.W., Van Loosdrecht M..C.M. and Heijnen J.J. (1998) The Sharon process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste. *WaterSci. Technol.* **36**, 135-142.
- Hernandez, D., Rowe, J.J. (1987). Oxygen regulation of nitrate uptake in denitrifying *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 745-750.
- Hochstein, L.I., Betlach, M., Kritikos, G. (1984). The effect of oxygen on denitrification during steady-state growth of *Paracoccus halodenitrificans*. *Arch. Microbiol.* **137**, 74-78.
- Hollender, J., Hopp, J., Dott, W. (2000). Cooxidation of chloro- y and methylphenols by *Alcaligenes xylosoxidans* JH1. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 445-450.
- Hulse, C.L., Averill, B.A. (1990). Isolation of high specific activity pink, monomeric nitrous oxide reductase from *Achromobacter cycloclastes*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **166**, 729-735.
- Iwasaki, H., Matsubara, T. (1971). Cytochrome c-557 (551) and cyochrome cd of *Alcaligenes faecalis*. *J. Biochem.* **69**, 847-857.
- Itoh, K., Mihara, Y., Toshima, Y. (2011). Characterization of microbial consortia that reductively dechlorinate 4-chlorophenol and transform phenol to benzoate enriched from estuarine sediment of Lake Shinji. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Foods Contaminants, and Agricultural Wastes.* **46**, 181-190.
- Ishizuka, M., Toroya T., Fukui, S. (1984). Purification, propiedades and limited proteolysis of nitrate reductase from *Pseudomonas denitrificans*. *Biochem. Biophys. Acta.* **786**, 133-143.



- Jackson, M.A., Tiedje, J.M., Averill, B.A. (1991). Evidence for an NO-rebound, mechanism for production of N<sub>2</sub>O from nitrite by the copper-containing nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes*. *FEMS Lett.* **291**, 41-44.
- Jetten, M., Logemann, S., Muyzer, G., Robertson, L., de Vries, S. and van Lossdrecht Kuenen, J. (1997). Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *Antonie van Leeuwenhoek.* **71**, 75-93.
- Jones, A.M., Hollocher, T.C. (1993). Nitric oxide reductase of *Achromobacter cycloclastes*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1144**, 359-366.
- Kallas, J., Munter, R. (1994) Post-Treatment of pulp and paper industry wastewaters using oxidation and adsorption processes. *Water Sci. Technol.* **29**, 259-272. of nitrogen compounds. *Antonie van Leeuwenhoek.* **71**, 75-93.
- Kakutani, T., Watanabe, H., Arima, K., Beppu, T. (1981). Purification and properties of copper-containing nitrite reductase from a denitrifying bacterium, *Alcaligenes faecalis* strain S-6. *J. Biochem.* **89**, 453-451.
- Kennes, K., Wu, W., Bhatnagar, L., Zeikus, J. (1996). Anaerobic dechlorination and mineralization of PCP and 2,4,6-TCP by methanogenic PCP-degrading granules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 801-806.
- Ketchum, P.A., Dnariatz, G., LeGall, J. Payne, W. (1991). Menaquinol-nitrate reductase of *Bacillus halodenitrificans*. *J. Bacteriol.* **173**, 2498-2505.
- Khan, M.Z., Mondal, P.K., Sabir, S. (2011). Bioremediation of 2-chlorophenol containing wastewater by aerobic granules-kinetics and toxicity. *J. Hazard. Mater.* **190**, 222-228.
- Knowles, R. (1982). Denitrification. *Microbiological Reviews.* **46**, 43-70.

- Konneke, M., Bemhard, A. E., de la Torre J.R. Walker C.B. Waterbury, J. B. and Stahl D.A. (2005). Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* **437**, 543-546.
- Körner, H., Zumft, W.G. (1989). Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1670-1676.
- Kristjansson, J.K., Hollocher, T.C. (1980). First practical assay for soluble nitrous oxide reductase of denitrifying bacteria and a partial kinetic characterization. *J. Biol. Chem.* **255**, 704-707.
- Kuai, L., Verstraete, W. (1998). Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification system. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(11): 4500-4506.
- Kuenen, J.C., Robertson, L.A., Tuovinen, O.H. 1992. The genera *Thiobacillus*, *Thiomicrospira*, and *Thiosphaera*. In: Balows A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer K.-H., editors. *The Prokaryotes*, Vol. 3. New York: Springer, p 2638-2657.
- Kuo, C., Genthner, S. (1996). Effect of added heavy metal ions biotransformation and biodegradation of 2-chlorophenol and 3-chlorobenzoate in anaerobic bacterial consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2317-2323.
- Lalucat, J., Bennisar, A., Bosch, R., García-Valdéz, E., and Palleroni, N.J. (2006). Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **70**, 510-547.
- Lam, Y., Nicholas, D.J.D. (1969). A nitrite reductase with cytochrome oxidase activity from *Micrococcus denitrificans*. *Biochim. Biophys. Acta.* **180**, 459-472.
- Laws, E. A. (1993). *Aquatic pollution –an introductory test-*. Interscience, USA. pp 55

- Lee, C.-Y., Lee Y.-P. (2007). Degradation of 4-chlorophenol by enriched mixed cultures utilizing phenol and glucose as added growth substrate. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 383-391.
- Li, S.F.Y. (1993). Capillary electrophoresis – principle, practice and applications. Elsevier, Netherlands. pp797.
- Li, Y.M., Li, J., Zheng, G.H., Luan, J.-F, Fu, Q.S., Gu, G.-W. (2008). Effects of the COD/NO<sub>3</sub>-N ratio and pH on the accumulation of denitrification intermediates with available pyridine as a sole electron donor and carbon source. *Environ. Technol.* **29**, 1297-1306.
- Lin, Y.-F., Chen, K.-C. (1995). Denitrification and methanogenesis in a co-immobilized mixed culture system. *Water Res.* **29**, 35-43.
- Loh, K.-C., Wang, S.-J. (1998). Enhancement of biodegradation of phenol and nongrowth substrate 4-chlorophenol by medium augmentation with conventional carbon sources. *Biodegradation.* **8**, 329-338.
- Loh, K.-C., Wu, T. (2006). Cometabolic transformation of 2-chlorophenol and 4-chlorophenol in the presence of phenol by *Pseudomonas putida*. *Can. J. Chem. Eng.* **84**, 356-367.
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. (2004). Brock, Biología de los Microorganismos. Pearson Educación. Madrid. pp 568-582.
- Majumder, P.S., Gupta, S.K. (2007). Removal chlorophenols in sequential anaerobic-aerobic reactors. *Bioresour. Technol.* **98**, 118-129
- Madsen, T. and Aamand, J. (1991) Effects of sulfuroxy anions on degradation of pentachlorophenol by methanogenic enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2453-2458.

- Martínez-Hernández, S., Olguín E. Gómez, J., Cuervo-López, F., (2009). Acetate enhances specific consumption rate of toluene under denitrifying conditions. *Arch. Environ Contam. Toxicol.* **57**, 679-687.
- Meza-Escalante, E., Texier, A.-C., Cuervo-López F., Gómez J., Cervantes, F. (2008). Inhibition of sulfide on the simultaneous removal of nitrate and *p*-cresol by a denitrifying sludge, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **83**, 372-377.
- Michalski, W., Nicholas, D.J. (1985). Molecular characterization of copper containing nitrite reductase from *Rhodoseudomonas sphaeroides* form sp. denitrificans. *Biochim. Biophys. Acta.* **828**, 130-137.
- Miller, J.B., Koshland, E. (1977). Membrane fluidity and chemotaxis: Effects of temperature and membrane lipid composition on the swimming behavior of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Mol. Boil.* (1977) **111**, 183-201.
- Mohn, W., Kennedy, K.(1992) Limited degradation of chlorophenols by anaerobic sludge granules. *Appl. Environ. Microbiol.* (1992) **58**, 2131-2136.
- Mohn, H., Puhakka, J.A., Ferguson, J.F. (1999). Effects of electron donors on degradation of pentachlorophenol in methanogenic fluidized bed reactor. (1999). *Environ. Technol.* **20**, 909-920.
- Moir, J.W.B., Baratha, D., Richardson, D.J., Ferguson, S.J. (1993). The purification of a cd1-type nitrite reductasa from, and the absence of copper-type nitrite reductase from, the aerobic denitrifier *Thiosphaera panthotropha*; the role of pseudoazurin as an electron donor. *Eur. J. Biochem.* **212**, 377-385.
- Muñoz, H., Armienta, a., Vera, A. (2004). Nitrato en el agua subterráneas a del valle de Huamatla, Tlaxcala, México. Ver. *Int. Contamin. Ambient.* **20**(3), 91-97.
- Nelson, P. O., Yang, M. (1995). Equilibrium adsorption of chlorophenols on granular activated carbon. *Wat. Environ. Res.* **67**, 892-898.

- Nordin, K., Unell, M., Jansson, J.K. (2005). Novel 4-chlorophenol degradation gene cluster and degradation route via hydroxyquinol in *Arthrobacter chlorophenolicus* A6. *Appl Environ. Microbiol.* **71**, 6538-6544.
- Oh, J. and Silverstein, J. (1994). Acetate limitation and nitrite accumulation during denitrification. *J. Environ. Eng.* **125**, 234-242.
- OMS (1989). Chlorophenols other than pentachlorophenol. Organización Mundial de la Salud, Ginebra.
- OMS, 2003: Chlorophenols in drinking-water., Organización Mundial de la Salud, Ginebra (Suiza) (WHO/SDE/WHIS/03.04/47).
- Peng Y.-Z, MA, Yong., Wang, S.-Y. (2007). Denitrification potential enhancement by addition of external carbon sources in a pre-denitrification process. *J. Environ. Sciences.* **19**, 284-289.
- Peña-Calva, A., Olmos, D. A., Viniegra, G. G., Cuervo, L. F., Gómez, J. (2004). Denitrification in presence of benzene, toluene and m-xylene. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **119**, 195-208.
- Pera-Titus., M., García-Molina, V., Baños, M. A., Giménez, J., Esplugas, S. (2004). Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation processes: a general review. *Appl. Catal. B.* **47**, 219-256.
- Pepelko, W.E., Gaylor, D.W., Mukerjee, D. (2005). Comparative toxic potency ranking of chlorophenols. *Toxicol. Ind. Health.* **21**, 93-111.
- Perkins, P.S., Komisar, S.J., Puhakka, J.A. and Ferguson, J.F. (1994). Effects of electron donors and inhibitors on reductive dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol. *Water Res.* **28**, 2101-2107.
- Phelps, C.D., Young, L. Y. (1999). Anaerobic biodegradation of BTEX and gasoline in various aquatic sediments. *Biodegradation.* **10**, 15-25.

- Rasmussen, T., Berks, B.C., Sanders-Loehr, J., Dooley, D. M., Zumft, W.G., Thomson, A.J. (2000). *Biochemistry*. **39**, 12753-12756.
- Reyes-Avila, J., Flores-Razo, E., Gomez, J. (2004). Simultaneous biological removal of nitrogen, carbon and sulfur by denitrification. *Water Res.* **38**, 3313-3321.
- Roberts, M.S., Anderson, R.A., Swarbrick, J. (1977). Permeability of human epidermis to phenolic compounds. *J. Pharm. and pharmacol.* **29**, 677-683.
- Sakurai, N. and Sakurai, T. (1998). Genomic DNA cloning of region encoding nitric oxide reductase in *Paracoccus halodenitrificans* and a structure model revelant to cytochrome oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**, 400-406.
- Sanford, R., Tiedje, J. (1997) Chlorophenol dechlorination and subsequent degradation in denitrifying microcosms fed low concentrations of nitrate. *Biodegradation* **7**, 425-434.
- Savan, D., Abdul-Rahman, R., Ranade D. (2006). Anaerobic degradation of adsorbable organic halides (AOX) from pulp and paper industry wastewater. *Bioresourse Technology* **97**, 1092-1104.
- Seidler, J.J., Landau, M., Dierberg, F. E., Pierce, R. H. (1986). Persistence of pentachlorophenol in wastewater-estuarine aquaculture system. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **36**, 101-108
- SEMARNAP (1997). Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.
- Schmidt, E., Hellwig, M., Knacksmuss (1983). Degradation of chlorophenols by defined mixed microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 1038-1044.

- Schmidt, I., Sliemers, O., Schmid, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J.G., Jetten, S.M., Strous, M. (2003). New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 481-492.
- Schneiter, R.W., Middlebrooks, E.J., Sletten, R. (1984). Wastewater lagoon sludge characteristics. *Water Res.* **8**, 861-864.
- Schomburg, G. (1990). Gas chromatography – a practical course. VCH, Federal Republic Germany, pp 320.
- Shoun, H., Kim, D.-H., Uchiyama, H. and Sugiyama J. (1992). Denitrification by fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* **94**, 277-281.
- Shrimali, M., Singh, K. P. (2001) New methods of nitrate removal from water. *Environ. Pollut.* **112**, 351-359.
- Silvestrini, M.C., Falcinelli, S., Ciabatti, I., Cutruzzolà, F., Brunori, M. (1994). *Pseudomonas aeruginosa* nitrite reductase (or cytochrome oxidase): An overview. *Biochemie.* **76**, 641-654.
- Shimizu, T., Furuki, T., Waki T., Ichikawa, K. (1978). Metabolic characteristics of denitrification by *Paracoccus denitrificans*. *J. Ferment. Technol.* **56**, 207-213.
- Smith, S., Furay, V.J., Layiwala P.J. y col. (1994). Devaluation of toxicity and quantitative structure-activity relationships (QSRA) of chlorophenols to the copepodid stage of marine copepod (*Tisbe battagliai*) and two species of benthic flatfish, the flounder (*Platichthys flesus*) and Sole (*Solea solea*). *Chemosphere.* **28**, 825-36.
- Solyanikova, I.P., Golovleva, L.A. (2005). Bacterial degradation of chlorophenols: Pathways, biochemical, and genetic aspects. *J. Environ. Sci. Health B.* **39**, 333-351.
- Somani, S.M., Khalique A. (1982). Distribution and metabolism of 2,4 dichlorophenol in rats. *J. Toxicol. Environ. Health.* **9**, 889-897.

- SooHoo, C.K., Hollocher, T.C. (1991). Purification and characterization of nitrous oxide reductase from *Pseudomonas aeruginosa* strain P2. *J. Biol. Chem.* **266**, 2203-2209.
- Sphapleigh, J.P., Payne, W.J.(1985). Differentiation of c,d1 cytochrome and copper nitrite reductase production in denitrifiers. *FEMS Microbiol. Lett.* **26**, 275-279.
- Strous, M., Heijnen, J.J., Kuenen, J.G. (1998). The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 589-596.
- Strous, M., Kuenen, J.G., and Jetten, S.M. (1999). Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (7), 3248-3250.
- Sung, D.W., Song, S.H., Kim, J.H., Yoo, Y. J. (2002). Effects of electron donors on nitrate removal by nitrate and nitrite reductase. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **7**, 112-116.
- Suzuki, S., Kataoka, K., Yamaguchi, K., Inoue, T., Kai, Y. (1999). Structure-function relationships of copper-containing nitrite reductases. *Coord. Chem. Rev.* **190-192**, 245-265.
- Thomas, S., Sarfaraz, S., Mishra L.C., Iyengar., L. (2002) Degradation phenol and phenolic compounds by defined denitrifying bacterial. *Journal of Microbiology and Biotechnology.* **18**, 57-63.
- Tarighian, A., Gill, G., Headley, J., Pedras, S. (2003). Enhancement of 4-chlorophenol biodegradation using glucose. *Clean. Techn. Environ. Policy.* **5**, 61-65
- Thomas, S., Sarfaraz, S., Mishra, L., Iyengar L.. (2002). Degradation of phenol and phenolic compounds by defined denitrifying bacterial, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 57-63.
- Thomsen, J.K., Geest, T. and Cox, R.P. (1994). Mass spectrometric studies of the effect of pH on the accumulation of intermediates in denitrification by *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 536-541.



- Tobajas, M., Monsalvo, V.M., Mohedano, A.F., Rodriguez J.J. (2012). Enhancement of cometabolic biodegradation of 4-chlorophenol induced with phenol and glucose as carbon sources by *Comamonas testosteroni*. *Journal of Environmental Managent.* **95**, S116-S121.
- Tschech A. and Fuchs G. (1987). Anaerobic degradation of phenol by culture of newly isolated denitrifying *Pseudomonas*. *Arch. Microbiol.* **148**, 213-217.
- Thomas, S., Sarfaraz, S., Mishra, L., Iyengar, L. (2002). Degradation of phenol and phenolic compounds by defined denitrifying bacterial, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 57-63.
- Tyler, J.E., Finn, R.K. (1974). Growth rates of pseudomonas on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid y 2,4-dichlorophenol. *Appl. Microbiol.* **28**, 182-184.
- U.S. Environmental Protection Agency (1987). Nitrate/Nitrite: Health Advisory, Office of Drinking Water, US Enviromental Protection Agency, Washintong, D.C.
- U.S. Environmental Protection Agency (1993). Innovative treatment technologies annual status report. 5<sup>th</sup> ed. EPA. 542-R-93-003, U.S. Environmental protection Agency, Washintong D.C., Table 1-1.
- Uden, G.,Becker, S., Bongaerts, J., Holighaus, G, Schirauski, J., Six, S. (1995). O<sub>2</sub> sensing and O<sub>2</sub>-dependent gene regulation in facultatively anaerobic bacteria. *Arch. Microbiol.* **164**, 81-90.
- Vallecillo, A., García-Encina, P.A., Peña, M. (1999).Anaerobic biodegradability and toxicity of chlorophenols. *Water Sci. Technol.* **40**, 161-168.
- Virtanen, M.T. and Hattula, M. (1982). The fate of 2,4,6 – trichlorophenol in an aquatic continuos – flow system. *Chemosphere.* **11**, 641-649.
- van Schie, P.M., Young, L.Y.(1998). Isolation and characterization of phenol-degrading denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2423-2438.

- Von Sperling, M (1996). Comparison among the most frequently used system for wastewater treatment in developing countries. *Water Sci. Tech.* **33**, 59-72.
- Wicht, H. (1996). A model for predicting nitrous oxide production during denitrification in activated sludge. *Water Sci. Technol.* **34**, 99-106.
- Wilson, P. and Bouwer, E.J. (1997). Biodegradation of aromatic compounds under mixed oxygen/denitrifying conditions: a review *J. Ind. Microbial Biotechnol.* **18**, 118-130.
- Woods, S., fergusosn, J. And Benjamin, M. (1989) Characterization of chlorophenol and chloromethoxybenzene biodegradation during anaerobic treatment. *Environ. Sci. Technol.* **23**, 62-68.
- Wu, Q., Knowles, R. (1995). Effect of chloramphenicol on denitrification in *Flexibacter Canadensis* and *Pseudomonas denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 434-437.
- Wu, Q., Knowles, R., Niven, D.F. (1995). Effect of ionophores on denitrification in *Flexibacter canadensis*. *Can. J. Microbiol.* **41**, 221-234.
- Ye, F.-x., Shen, D.-s. (2004). Acclimation of anaerobic sludge degrading chlorophenols and the biodegradation kinetics during acclimation period. *Chemosphere.* **54**, 1573-1580.
- Yu., Q., She., Z.-L., Li, Y.-Q. (2010). Adsorptive capacity of 4.chlorophenol by four adsorbents. *Urban Environment & Urban Ecology*. Doi: CNKI:SUN:CHCS.0.2010-03-008.
- Zhang, X., Wiegel, J. (1990) Sequential anaerobic degradation of 2,4-dichlorophenol in freshwater sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1119-1127.
- Zimbron, J. A., Reardon, K. F. (2009). Fenton's oxidation of pentachlorofenol. *Wat. Res.* **43**, 1831-1840.

- Zita, A., Hermansson, M. (1994). Effects of ionic strength on bacterial adhesion and stability of flocs in a wastewater activated sludge system. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3041-3048.
- Zumft, W.G., Gotzmann, D., Kroneck, P.M.H. (1987). Type I, blue copper proteins constitute a respiratory nitrite-reducing system in *Pseudomonas aureofaciens*. *Eur. J. Biochem.* **168**, 301-307.
- Zumft, W.G., Döhler, K., Körner, H., Löchelt, S., Viebrock, A., Frunzke, K. (1988). Defects in cytochrome  $cd_1$ -dependent nitrite respiration of transposon Tn5-induced mutants from *Pseudomonas stutzeri*. *Arch. Microbiol.* **149**, 492-498.
- Zumf, W.G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 533-616.

# **JUSTIFICACIÓN**

## 2. JUSTIFICACIÓN

Las actividades humanas han modificado el entorno y alterado los ciclos biológicos. El ciclo del nitrógeno se ha alterado por el aumento en el uso de combustibles fósiles, la creciente demanda de nitrógeno en la agricultura y la industria. Si sumamos a esto, la interacción con otros ciclos biológicos como el del carbono, la situación se complica. Por ejemplo la introducción en el ambiente de compuestos organoclorados, como el 2-clorofenol, que es un compuesto recalcitrante, hacen necesario el desarrollo de tecnologías que permitan la eliminación de estos compuestos sin la generación de problemas colaterales. Los métodos fisicoquímicos, aunque son rápidos, en algunas ocasiones solo trasladan el contaminante de un lugar a otro o generan, en la mayoría de los casos, productos secundarios (algunos tóxicos), que tienen que ser eliminados a través de la combinación de distintos procesos, lo que eleva su costo. Los procesos biológicos, en cambio, son una alternativa atractiva económicamente. En la eliminación aerobia del 2-CF se han obtenido en ocasiones eficiencias de eliminación y velocidades de consumo altas, sin embargo, también se pueden formar intermediarios metabólicos inhibitorios que se acumulan en el medio. Aunque en condiciones anaerobias no se ha observado la formación de productos inhibitorios, el proceso en la mayoría de los casos es lento. Por su parte, la desnitrificación permite la eliminación simultánea de contaminantes nitrogenados ( $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$ ) y carbonados, con eficiencias y velocidades altas. Sin embargo, hay poca información de la eliminación simultánea de 2-CF y nitrato, del efecto de la adición de fuentes reductoras externas y del efecto del 2-CF sobre un consorcio desnitrificante. Con la finalidad de aumentar el conocimiento del comportamiento de un lodo desnitrificante en presencia de 2-CF y tener la posibilidad de obtener un mejor control del proceso, sería relevante aportar más datos, que no sólo indiquen la desaparición de sustratos, sino que también identifiquen su destino. Todo esto mediante el uso de variables de respuesta como rendimientos de formación de productos, eficiencias y velocidades específicas de consumo.

# **OBJETIVOS**

## 3. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo general

Obtener evidencia de la eliminación del 2-clorofenol por un lodo desnitrificante bajo condiciones anaerobias en cultivos en lote.

### 3.2 Objetivos particulares

En cultivos en lote, evaluar y analizar a través de variables de respuesta como velocidades de consumo, eficiencias y rendimientos:

1. La eliminación del 2-CF en condiciones desnitrificantes a una C/N estequiométrica (1).
2. El consumo del 2-CF por un lodo desnitrificante y la influencia de diferentes concentraciones de acetato o fenol como fuentes externas de electrones en el consumo del 2-CF.
3. El efecto de diferentes concentraciones de distintos donadores de electrones (acetato, fenol o glucosa), sobre la eficiencia y velocidad específica de consumo del 2-CF en condiciones anaerobias en ausencia de nitrato.
4. El efecto de la presencia y ausencia del 2-CF sobre el proceso desnitrificante, utilizando diferentes donadores de electrones (fenol, acetato o glucosa).

# METODOLOGÍA

La metodología de manera general consistió en tres partes:

En la primera parte, se estudió la eliminación del 2-CF en condiciones denitrificantes y se evaluó el efecto de la adición de fuentes externas de electrones. En la segunda parte se evaluó el efecto de diferentes donadores de electrones sobre la eliminación del 2-CF en ausencia de nitrato. Por último, en la tercera parte, se estudió el efecto del 2-CF sobre el proceso desnitrificante. En el presente capítulo se presenta la metodología general, haciendo énfasis en la obtención del inóculo y las técnicas analíticas empleadas. Más adelante, en resultados, se detalla cada parte de manera particular.



## 4. METODOLOGÍA

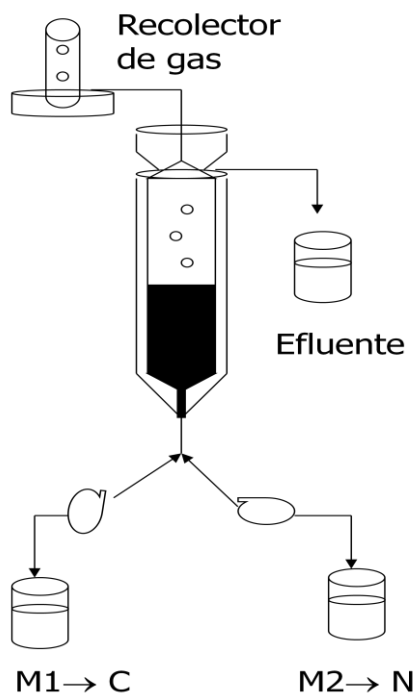
### 4.1 Diseño y operación del reactor UASB

Se puso en marcha un reactor anaerobio de cama de lodos de flujo ascendente UASB (siglas en inglés, upflow anaerobic sludged blanket), alimentado en continuo bajo condiciones desnitrificantes. Las características del reactor fueron las siguientes: 6.4 cm de diámetro interno y 46 cm de largo. La parte superior del reactor presentaba un estrechamiento de aproximadamente 2cm de longitud cuya finalidad es dirigir el biogás generado a la campana de separación líquido-biogás-biomasa (Figura 4.1). Para la medición del biogás, la campana separadora del reactor, estaba conectada a una columna de vidrio invertida con una solución saturada de NaCl, para evitar que el biogás producido se disolviera en el líquido Figura 4.2.



**Figura 4.1** Reactor UASB en el laboratorio.

El pH del sistema fue de  $6.95 \pm 0.2$  y la temperatura se mantuvo a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mediante el uso de un circulador de agua termo Haake (mod B3), con un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 2 días y una concentración de biomasa microbiana de  $6 \pm 1\text{ g}$  de sólidos suspendidos volátiles SSV/L. El volumen de trabajo fue de 1.4L.



**Figura 4.2** Esquema del reactor UASB

El medio de cultivo fue alimentado con dos soluciones por separado, una contenía la fuente de carbono y la otra la fuente de nitrógeno, de esta forma se evitaron los cambios de concentración de los influentes debido a posibles precipitaciones. Se operó en dos etapas, en la primera, la fuente de carbono fue una mezcla de acetato y fenol (Tabla 4.1) y en estas condiciones el reactor fue alimentado continuamente por 17 meses. Al medio de cultivo le fueron adicionados los elementos traza para tener la siguiente concentración final (mg/L):  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (7.5),  $\text{Na}_2\text{Mo}_4\text{H}_2\text{O}$  (1),  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (70),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (7),  $\text{MnCl}_2$  (5).

Durante este periodo la velocidad de carga del carbono total fue de  $112.87 \pm 7.6$ , la eficiencia de eliminación de fenol fue de  $99.9 \% \pm 0.4$ , la velocidad de producción de carbono inorgánico fue de  $78.58 \pm 6.5$  mg/L d y el rendimiento de  $0.70 \pm 0.09$  g C- $\text{NaHCO}_3^-$ /g C-orgánico consumido. No se observó la acumulación de intermediarios nitrogenados (nitrito,  $\text{N}_2\text{O}$ ), ni de nitrato en el efluente. La velocidad de carga de  $\text{N-NO}_3^-$  a la entrada fue de  $83.24 \pm 4.8$  mg/L d y la velocidad de producción de  $\text{N}_2$  fue de  $86.4 \pm 5.42$  mg/L d por lo que podemos decir que el proceso desnitrificante operó en régimen estacionario, con una eficiencia de eliminación de nitrato de  $99.28 \% \pm 1.69$ . El rendimiento desnitrificante ( $Y_{\text{N}_2}$ ) fue de  $0.96 \pm 0.5$  g  $\text{N}_2$ /g  $\text{N-NO}_3^-$ .

En la segunda etapa la fuente de carbono y energía fue solamente el C-acetato (0.8 g/L). La composición del influente fue la siguiente (g/L):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (3),  $\text{MgSO}_4$  (0.03),  $\text{NaNO}_3$  (2.42). La composición de los elementos traza fue la misma descrita en la Tabla 4.1. El sistema fue operado de esta forma aproximadamente por un periodo de 5 meses.

**Tabla 4.1** Composición química del medio de cultivo etapa 1

<b>Solución 1</b>	<b>(g / L)</b>	<b>Solución 2</b>	<b>(g / L)</b>
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1.44	$\text{NaNO}_3$	2.02
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.54	$\text{NH}_4\text{Cl}$	0.15
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	$\text{NaHCO}_3$	0.34
C-acetato	0.1393		
C- $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$	0.298		

Durante este periodo la velocidad de carga del carbono total fue de  $201.75 \pm 7.97$  mg/L d, la eficiencia de eliminación de acetato fue de  $95.87 \% \pm 3$ , la velocidad de producción de carbono inorgánico fue de  $185.29 \pm 16.68$  mg/L d y el rendimiento de  $0.95 \pm 0.04$  g C-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/g C-orgánico consumido. En la segunda etapa, no se detectó la formación de intermediarios nitrogenados, ni la presencia de nitrato a la salida del reactor. La velocidad de carga de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a la entrada fue de  $100.93 \pm 3.11$  mg/L d y la velocidad de producción de N<sub>2</sub> fue de  $78.87 \pm 3.22$  mg/L d por lo que podemos decir que el proceso desnitrificante operó en régimen estacionario, con una eficiencia de eliminación de nitrato de  $98.91 \% \pm 3.5$ . El rendimiento desnitrificante ( $Y_{N_2}$ ) fue de  $0.79 \pm 0.042$  g N<sub>2</sub> / g N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Bajo estas condiciones la biomasa del reactor UASB fue utilizada como inóculo.

## 4.2 Fuente de inóculo

El inóculo empleado para los cultivos en lote fue obtenido de un reactor UASB en estado estacionario, el cual fue previamente centrifugado a 4000 rpm por 5 minutos y lavado tres veces con una solución de NaCl (9 g/L) antes de ser utilizado.

## 4.3 Ensayos en lote

El desarrollo experimental de este trabajo se llevó a cabo en tres etapas. En la primera, el inóculo provino del reactor UASB de la etapa 1, donde se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de acetato o fenol sobre la eliminación del 2-CF en condiciones iniciales desnitrificantes; en la segunda parte se utilizó el inóculo proveniente de la etapa 2, de igual forma se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de los donadores de electrones (glucosa, acetato o fenol), pero en ausencia de nitrato. Por último, en la tercera etapa, se utilizó el inóculo proveniente de la etapa 2 y se evaluó el efecto de la presencia del 2-CF en el proceso desnitrificante usando fenol, acetato o glucosa como fuente reductora. Más adelante, en resultados, se detalla cada parte de manera particular.

#### 4.4 Métodos analíticos.

En la Tabla 4.3 se muestran los métodos analíticos utilizados para la determinación de diferentes compuestos. Se puede observar que son métodos reproducibles con coeficientes de variación (C.V.) bajos. Más adelante se detalla cada uno individualmente.

**Tabla 4.3** Métodos analíticos utilizados para la determinación de diferentes compuestos carbonados y nitrogenados

Compuesto	Método analítico	Pendiente	R <sup>2</sup>	C.V.
2-CF	HPLC	6825 ± 200	0.995 ± 0.002	2.9
Fenol	HPLC	5421.13 ± 99.58	0.999 ± 0.00005	1.83
Carbono Total.	TOC	1.824 ± 0.0655	0.990 ± 0.009	3.59
Carbono Inorgánico	TOC	6.449 ± 0.031	0.999 ± 0.004	0.49
Acetato	Cromatografía de gases	40.339 ± 0.09	0.997 ± 0.004	0.32
Propionato	Cromatografía de gases	63.306 ± 0.64	0.9996 ± 0.0008	1.00
Nitrato	CIA	777.13 ± 9.2	0.993 ± 0.007	1.18
Nitrato	HPLC	20769.5 ± 253.8	0.997 ± 0.002	1.22
Nitrito	CIA	514.51 ± 6.5	0.994 ± 0.001	1.25
N <sub>2</sub>	Cromatografía de gases	197.62 ± 13.24	0.990 ± 0.009	6.59
Metano	Cromatografía de gases	258.35 ± 18.846	0.998 ± 0.009	7.29

#### 4.4.1 Cuantificación de 2-clorofenol, fenol y otros compuestos aromáticos

La concentración de 2-CF y fenol fue determinada usando cromatografía de líquida de alta eficiencia (High performance liquid chromatography, HPLC). La muestra y la fase líquida pasan a través de una columna que contiene la fase estacionaria, mediante el bombeo de la fase líquida se obtiene una alta presión en la columna donde por interacciones químicas diferenciales se realiza la separación. Se utilizó un HPLC Perking Elmer (series 200 UV), con una columna C-18 (Phenomenex), acetonitrilo-agua (60:40 v/v) como fase móvil y un flujo de 1.5 mL/min. Los compuestos fenólicos fueron detectados a una longitud de onda de 274 o 254 nm. Las muestras previamente se filtraron utilizando una membrana de nylon de 0.45 $\mu$ m de tamaño de poro. El volumen de inyección fue de 20  $\mu$ L. En la Figura 4.4 se muestra una curva estándar de 2-clorofenol.

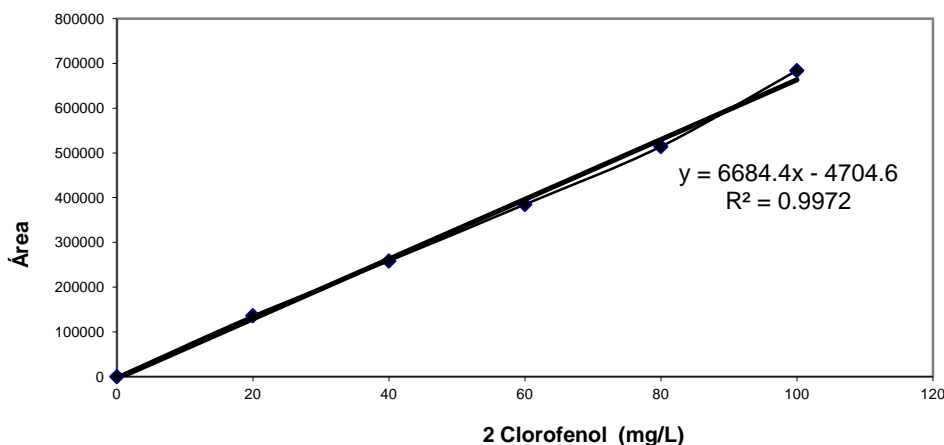
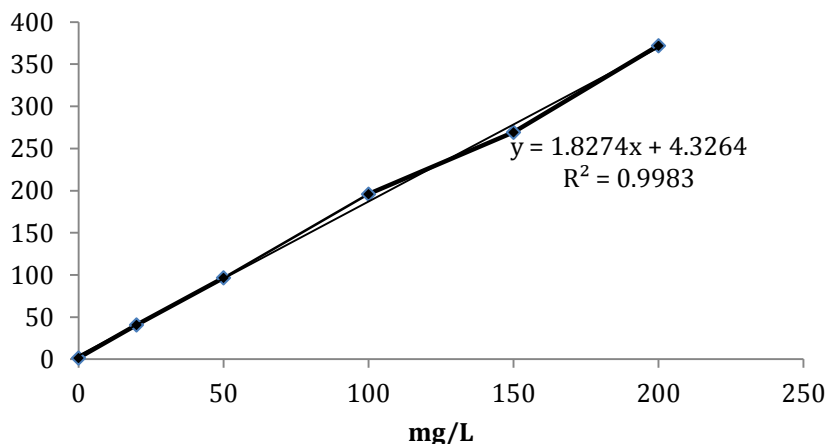


Figura 4.4 Curva estándar para la determinación de 2-clorofenol.

#### 4.4.2 Carbono

El carbono orgánico y el inorgánico fueron determinados por analizador de carbono orgánico total (TOC) (Shimadzu, TOC-VCSN). El equipo cuenta con un tubo de combustión para carbón total que contiene un catalizador y es calentado a 680°C. Como gas de arrastre utiliza aire de alta pureza. La muestra se introduce mediante un inyector

al tubo de combustión en donde los componentes del carbono total se descomponen. Los productos de la combustión pasan por un analizador de gas infrarrojo, en donde es detectado el CO<sub>2</sub>, cuya área es calculada por un procesador de datos. El área es proporcional a la cantidad de carbono en la muestra. En la Figura 4.5 se muestra una curva estándar de carbono total a diferentes concentraciones.



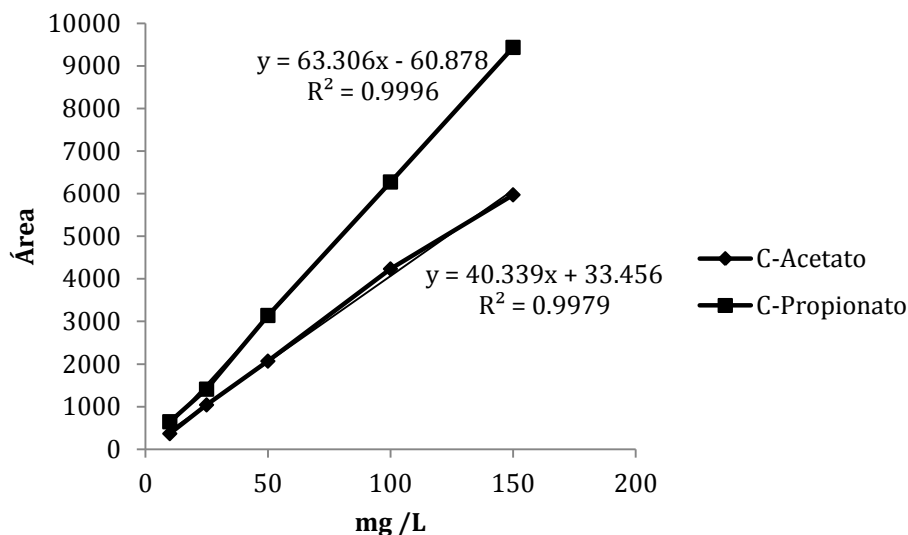
**Figura 4.5** Curva estándar de carbono orgánico total a diferentes concentraciones.

#### 4.4.3 Acetato y propionato

El acetato y propionato fueron cuantificados por cromatografía de gases (Hewlett Packard Series II modelo 5890. NJ USA) con un detector de ionización de flama y una columna AT 1000 (10m x 0.53mm y 1.2 μm de diámetro interno, USA). El gas acarreador fue nitrógeno a un flujo de 5 mL/min. La temperatura de la columna fue una rampa con una temperatura inicial de 80°C a una velocidad de 25°C/min hasta una temperatura final de 120, la temperatura del inyector y detector fueron de 150 y 130 °C respectivamente.

También se midió el acetato en un cromatógrafo de gases Varian Star 3400 con detector de ionización de flama (FID). Se utilizó una columna de acero inoxidable de 1.2 m de longitud empacada con Poropaq Q malla 80-10, el gas acarreador fue N<sub>2</sub> con las siguientes condiciones de operación: temperatura de la columna 180 °C, temperatura del

inyector 230 °C y temperatura del detector 250°C. En la Figura 4.6 se muestra una curva estándar de acetato y de propionato.



**Figura 4.6** Curva estándar para la determinación de acetato y propionato

#### 4.4.4 Cuantificación de glucosa

La glucosa fue cuantificada utilizando el analizador bioquímico YSI 2700 (YSI Inc). Este aparato utiliza membranas que contienen enzimas inmovilizadas específicas para el sustrato a cuantificar. Para la glucosa se utilizó la membrana YSI 2365. El analizador realiza una autocalibración con una solución de referencia de 2.5 g glucosa /L. El volumen de la muestra fue de 25  $\mu$ L, teniendo cuidado de hacer las diluciones necesarias para que la concentración estuviera dentro del intervalo de sensibilidad del aparato. La linealidad de la respuesta tiene un coeficiente de variación del 2%.

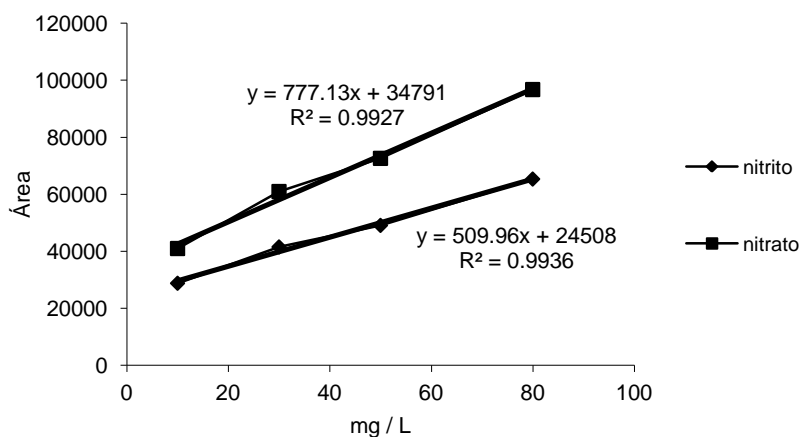
#### 4.4.5 Cuantificación de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y nitrito ( $\text{NO}_2^-$ )

La cuantificación de nitrito y nitrato se realizó utilizando dos técnicas analíticas. En la primera, el nitrito y nitrato fueron determinados por HPLC (columna IC-Pak Anión



HC, Water) a 214 nm. La fase móvil fue una mezcla de una solución de borato-gluconato (20 ml), butanol (20 ml), acetonitrilo (120 ml) diluido a 1L, y el flujo fue de 2 mL/min. La composición de la solución de gluconato fue la siguiente (g /L): gluconato de sodio (16), ácido bórico (18), tetraborato de sodio decahidratado (25) and 250 mL of glicerol (IC-Pack Column Manual, Waters).

En la segunda, se utilizó la electroforesis capilar de iones (Li, 1993; Gómez y col., 1996). El método se basa en la migración electroforética de iones al aplicar un voltaje a través de un capilar, causando una migración diferencial de los componentes de la muestra cargada eléctricamente hacia el electrodo positivo. Dependiendo de la polaridad de la energía suministrada y la composición del electrolito, el ión separado pasa a través de un detector. Se utilizó un analizador capilar de iones Beckman Coulter (ProteomeLab™ PA800), a temperatura ambiente. Como capilar se empleó una columna de sílice fundida, de 60cm de largo y 75 µm de diámetro interno con una corriente máxima de 300 µA, y un voltaje de 11 KV. La absorbancia se midió en la región ultravioleta a 214 nm. Solución de electrolito: 5mL Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3M, 5mL NaCl 10 mM y 5mL de una solución OFM-Anion BT (CIA PAK™), se afora a 50 mL. Se filtra la solución con una membrana de 0.45 micras. En la Figura 4.7 se muestra una curva estándar de nitrato y nitrito.

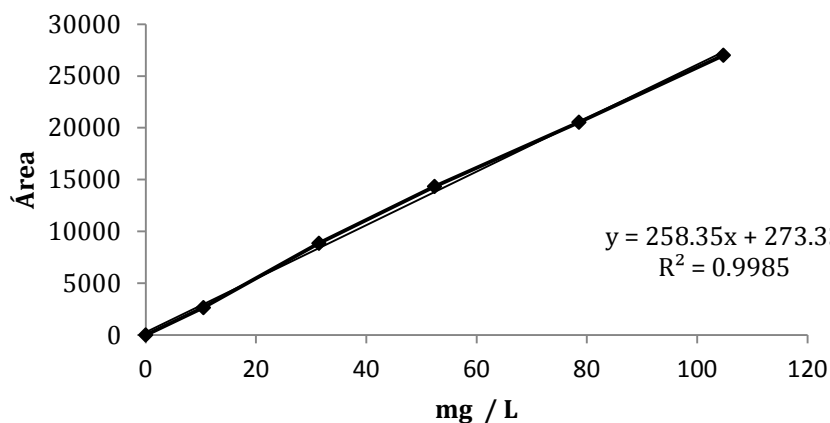


**Figura 4.7** Curva estándar para la determinación de nitrato y nitrito

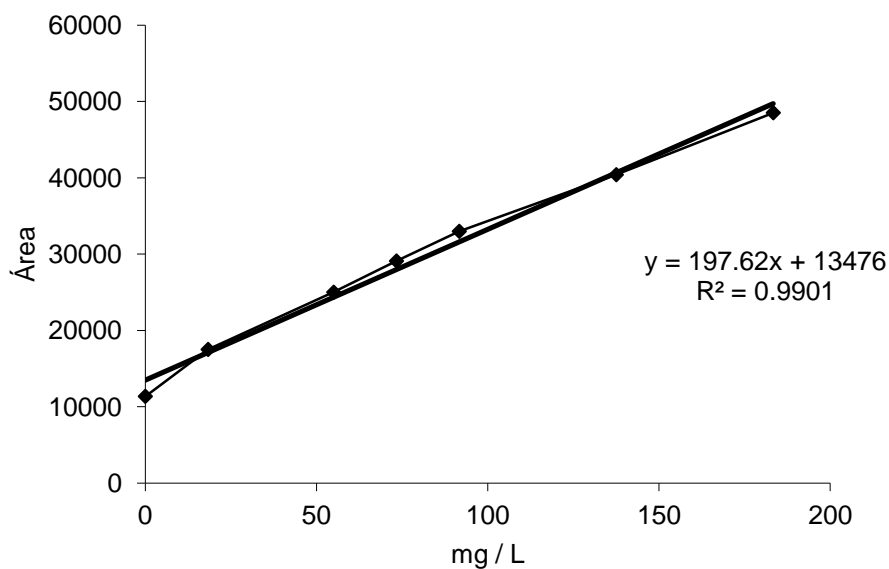
#### 4.4.5. Nitrógeno, dióxido de carbono, metano y óxido nitroso

El N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O and CH<sub>4</sub> fueron determinados por cromatografía de gases (Varian 3350, USA), utilizando un detector de conductividad térmica (Schomburg, 1990). La columna fue de acero inoxidable de 1.2 m de largo y de 1/8" de diámetro, empacada con poropak Q de malla 80-100. La fase móvil fue helio a un flujo de 16 mL/min. El volumen de inyección fue de 0.1mL y las condiciones de operación fueron las siguientes: Columna: 50 °C, inyector 100° C y detector 100 °C. En el reactor en continuo se tomó periódicamente la muestra del gas producido y recolectado a través del sistema de recolección de gas. El volumen de gas generado se calculó considerando la presión atmosférica de la ciudad de México (0.8 atm) y la temperatura de operación (30°C) del reactor. Se calculó la producción volumétrica de N<sub>2</sub> (mol N<sub>2</sub>/ L d) y se expresó finalmente en mg/ L d.

Para medir el N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> en los ensayos en lote se construyó una curva estándar de mg/L vs. área, basada en la ecuación de los gases ideales:  $n = PV/RT$ . Se prepararon una serie de botellas con un volumen de fase gaseosa conocido. Se purgaron con helio y se inyectó una cantidad conocida de N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> o CO<sub>2</sub> conocida (5, 10 mL, etc.), Después se realizó la medición de los gases en el cromatógrafo y se anotaron las áreas. Por último se construyó una curva estándar graficando mg/L vs área obtenida. En la Figura 4.8 se muestra la curva de calibración para metano y en la Figura 4.9 se muestra la curva de calibración para N<sub>2</sub>.



**Figura 4.8** Curva estándar de metano a diferentes concentraciones utilizada para los cultivos en lote.



**Figura 4.9** Curva estándar de  $N_2$  a diferentes concentraciones utilizada para los ensayos en lote.

#### 4.4.6. Sólidos suspendidos

La medición de los sólidos suspendidos se realizó como indica el método establecido por APHA (1985). Para la determinación de los sólidos suspendidos totales (SST), la muestra es secada a 110 °C durante 1 hora, posteriormente la muestra es

calcinada a 550°C durante una hora con el fin de obtener los sólidos suspendidos fijos (SSF). Los sólidos suspendidos volátiles (SSV) presentes en la muestra son el resultado de la resta de los sólidos suspendidos totales menos los sólidos suspendidos fijos. De tal manera que:

$$\text{SSV} = \text{SST} - \text{SSF}$$

#### 4.5 Bibliografía

APHA (1985). Estándar methods for examination of water and wastewater. 16<sup>th</sup> ed. American Public Health Association, Washington D.C.

Gómez, J., Méndez, R., Lema, J. (1996). The effect of antibiotics on nitrification process: Batch assays. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **57**, 869-876.

Li, S.F.Y. (1993). Capillary electrophoresis – principle, practice and applications. Elsevier, Netherlands. pp 797.

Schomburg, G. (1990). Gas chromatography – a practical course. VCH, Federal Republic of Germany, pp 320.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo se dividen en tres partes. En la primera parte se estudió la eliminación del 2-clorofenol en condiciones desnitrificantes a una relación C/N estequiométrica. Posteriormente, se estudió el efecto de la adición de un donador externo de electrones (acetato o fenol) sobre el consumo del 2-clorofenol. En la segunda parte, se estudió el efecto de diferentes tipos y concentraciones de distintos donadores de electrones para la eliminación del 2-clorofenol por un lodo desnitrificante en ausencia de nitrato. En la tercera parte se evaluó el proceso desnitrificante en presencia y ausencia del 2-CF, con diferentes donadores de electrones (fenol, acetato o glucosa). Además, para evaluar la recuperación del inóculo, se realizaron dos ensayos cinéticos adicionales, uno utilizando un inóculo expuesto previamente al 2-clorofenol (72d) y otro sin exposición al 2-clorofenol utilizando acetato como fuente reductora.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Efecto de la adición de acetato y fenol sobre el consumo del 2-clorofenol por un lodo desnitrificante.

Los resultados de esta sección están publicados en:

Martínez-Gutiérrez, E., González-Márquez, H., Martínez-Hernández, S., Texier, A.-C., Cuervo-López, F., Gómez, J. (2012). Effect of phenol and acetate addition on 2-chlorophenol consumption by a denitrifying sludge. *Environ. Technol.* **33**(12), 1375-1382.

#### 5.1.2 Resumen

Los clorofenoles están ampliamente distribuidos en el ambiente. Varias estrategias han sido empleadas para mejorar su consumo sobre condiciones anaerobias, sin embargo, la información es escasa. El objetivo de este estudio fue evaluar, en cultivos en lote, el consumo del 2-clorofenol (2-CF) por un lodo desnitrificante y la influencia de cosustratos como el acetato y el fenol en el consumo del 2-CF. Se observó que el fenol (69 y 92 mg C-fenol/L) y el acetato (60 y 108 mg C-acetato/L) mejoraron el consumo del 2-CF del lodo desnitrificante, incrementando la eficiencia (hasta 100%) y la velocidad específica de consumo de 2-CF. Cuando el fenol fue adicionado a 92 mg C/L, la velocidad específica de consumo de 2-CF se incrementó 2.6 veces con respecto al control sin cosustratos, mientras que con acetato (108 mg C/L) el incremento fue de 9 veces. El acetato parece ser el mejor cosustrato para el consumo del 2-CF, obteniendo velocidades específicas de consumo de  $2.48 \pm 0.14$  mg C-2-CF/g SSV d a 108 mg c-acetato/L. El balance de masa indicó que el lodo desnitrificante mineralizó simultáneamente el 2-CF, el fenol o el acetato ( $E_{2\text{-CF}}$ ,  $E_{\text{fenol}}$  y  $E_{\text{acetato}}$  cercanas al 100%,  $Y_{\text{HCO}_3^-}$  de  $0.9 \pm 0.1$ ) y el nitrato se redujo a nitrógeno molecular ( $E_{\text{NO}_3^-}$  de 100% y  $Y_{\text{N}_2}$  de  $0.96 \pm 0.02$ ). Esto mostró que la adición de cosustratos como fenol o acetato puede ser una buena alternativa para mejorar la eliminación de clorofenoles de las aguas residuales por lodos desnitrificantes.

**Palabras clave:** desnitrificación, 2-clorofenol, acetato, fenol, velocidad específica.

### 5.1.2 Introducción

Los clorofenoles (isómeros *orto*, *meta* y *para*). Son compuestos xenobióticos ampliamente usados en la industria del papel, insecticidas, fungicidas herbicidas y tintes. Su excesivo uso como pesticidas en la agricultura es la principal causa de su presencia en aguas superficiales y subterráneas, alcanzando concentraciones hasta de 20 mg/L (Valo y col., 1984; Seidler y col., 1986; Downs y col., 1999). La mineralización microbiana puede ser una estrategia útil para la eliminación de los clorofenoles de las agua residuales y otros medios ambientes contaminados (Puhakka y col., 1995).

La eliminación biológica del 2-clorofenol (2-CF) ha sido más extensamente estudiada sobre condiciones aerobias que sobre condiciones anaerobias. Sobre condiciones aerobias se ha observado que los compuestos clorados pueden ser usados como fuente de carbono y electrones para el crecimiento bacteriano (Fava y col., 1995; Kafkewitz y col., 1996). Sin embargo, en algunos casos, cultivos mixtos aerobios fueron incapaces de eliminar completamente los clorofenoles y se acumularon metabolitos tóxicos (Schmidt y col., 1983, Farrel y Quilty, 1999). El consumo anaerobio de los clorofenoles ha sido principalmente investigado sobre condiciones metanogénicas y se ha observado que puede ser iniciado por la descloración reductiva (Gibson y col., 1986; Dietrich y Winter, 1990; Mohn y col., 1999; Basu y col., 2005). Sobre condiciones desnitrificantes, el consumo de los clorofenoles ha sido escasamente estudiado. Chang y col. (2004) evaluaron la eliminación del 2-CF usando un lodo desnitrificante, encontrando que el 2-CF fue consumido después de 120 días de aclimatación, pero no mencionan los productos finales o las velocidades obtenidas. Bae y col. (2002) observaron el consumo del 2-CF por cultivos enriquecidos sobre condiciones desnitrificantes cuando un exceso de nitrato fue establecido (C/N cercana a 0.1 mientras

que, el valor estequiométrico es de 0.98). Sin embargo, no se mencionaron la formación de productos carbonados ni la formación de  $N_2$ . Ha sido reportado que el consumo de 2-CF en cultivos desnitrificantes en lote es un proceso lento (Hägglom y col., 1993; Bae y col., 2002). Bae y col. (2002), observaron que se necesitaron más de 88 días para la eliminación total de 13 mg C-2-CF/L. Se ha sugerido que la principal dificultad para la oxidación de los clorofenoles se debe a la fuerte estabilidad del compuesto aromático (Farrel y Quilty, 2002).

Algunas estrategias se han propuesto para mejorar el consumo de los clorofenoles. Estas incluyen la adaptación celular al contaminante y la adición de fuentes de carbono alternativas (cosustrato) (Farrel y Quilty, 2005). Se ha sugerido que la adición de fuentes de carbono fácilmente oxidables pueden actuar como agentes inductores de las enzimas oxidantes o pueden suministrar el poder reductor para el consumo de los compuestos orgánicos recalcitrantes (Dietrich y Winter, 1990; Wang y Loh, 2000; Martínez-Hernández y col., 2009). Por otra parte, la adición de fuentes externas de carbono pueden ser necesarias para el consumo de los clorofenoles cuando la vía inicia con la descloración reductiva (Fetzner, 1998; Vallecillo y col., 1999; Field y Sierra-Alvarez, 2008). En este sentido Sanford y Tiedje (1997), evaluaron la descloración del 2-CF usando acetato. Los autores proponen que el fenol producido fue posteriormente desnitrificado por el lodo. Sin embargo, son necesarias más investigaciones para entender mejor los procesos oxido-reductivos involucrados. Por ejemplo, los análisis de balance de masa ayudarían a tener evidencia más clara del destino del acetato en el proceso de descloración y que la oxidación del fenol podría estar acoplada a la reducción del nitrato.

En el presente, no está clara la influencia de fuentes externas de carbono y electrones en el consumo del 2-CF por desnitrificación. El uso de variables de respuesta como rendimientos, velocidades específicas de consumo y balances de masa pueden dar información cuantitativa acerca del efecto del cosustrato en la eliminación del 2-CF. Un mejor entendimiento del consumo del 2-CF por el proceso desnitrificante puede resultar



en propuestas adecuadas para su eliminación de los sitios contaminados. Así, que el objetivo de este estudio fue evaluar en cultivos en lote el consumo del 2-CF por un lodo desnitrificante y la influencia de diferentes concentraciones de acetato o fenol como cosustratos en el consumo del 2-CF.

### 5.1.3 Materiales y Métodos

#### 5.1.3.1 Fuente de inóculo

El inóculo usado para los experimentos en lote fue obtenido de un reactor anaerobio de cama de lodos de flujo ascendente (UASB, upflow anaerobic sludge blanket) con un volumen de trabajo de 1.4 L ( $6.0 \pm 1.2$  g de sólidos suspendidos volátiles SSV/L). El medio usado para alimentar el reactor UASB tenía la siguiente composición (g/L):  $K_2HPO_4$  (1.44),  $KH_2PO_4$  (0.54),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.10),  $NaNO_3$  (2.02),  $NH_4Cl$  (0.15),  $NaHCO_3$  (0.34). Los compuestos traza fueron adicionados para tener la siguiente concentración final (mg/L):  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (7.5),  $Na_2MoO_4 \cdot H_2O$  (1),  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  (70),  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (7),  $MnCl_2$  (5). Se adicionó una mezcla de acetato (0.231 g C-acetato/L) y fenol (0.298 g C-fenol/L) como fuente de carbono y energía. El sistema fue operado continuamente por 17 meses sobre condiciones desnitrificantes en estado estacionario a 30 °C y con un tiempo de residencia hidráulica de 2 d. Bajo estas condiciones experimentales, las eficiencias de consumo de nitrógeno y carbono fueron cercanas al 100% y ambos rendimientos de nitrógeno y carbono tuvieron valores altos ( $Y_{N_2} = 0.96 \pm 0.05$  mg  $N_2$ / mg N- $NO_3^-$  consumido and  $Y_{HCO_3^-} = 0.70 \pm 0.09$  mg C- $HCO_3^-$  / mg carbono orgánico total consumido). Así, que se puede concluir que el lodo desnitrificante fue fisiológicamente estabilizado. El inóculo obtenido del reactor UASB fue centrifugado a 4000 *g* por 10 min a y lavado tres veces con una solución de NaCl (9 g/L) antes de ser usado en los ensayos en lote.

### **5.1.3.2 Ensayos en lote**

Los ensayos fueron llevados a cabo en botellas serológicas (unidades experimentales) de 60 mL con un volumen de trabajo de 50 mL. El medio mineral usado en todos los ensayos fue el siguiente (g/L):  $K_2HPO_4$  (0.72),  $KH_2PO_4$  (0.27),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.03),  $NaHCO_3$  (0.026). Los elementos traza fueron adicionados para tener la siguiente concentración final (mg/L):  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (7.5),  $Na_2Mo_4H_2O$  (1),  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  (70),  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (7),  $MnCl_2$  (5). La concentración de la biomasa desnitrificante fue de 0.5 g SSV/L  $\pm$  0.04. Las botellas fueron selladas con tapas de goma y con contratapas de aluminio y el espacio de cabeza fue reemplazado con una corriente de He durante 10 min. El pH inicial fue  $7 \pm 0.1$ . Las unidades experimentales fueron incubadas a 30°C y agitadas a 200 rpm.

### **5.1.3.3 Ensayos control**

Primero, se realizaron ensayos abióticos en ausencia del lodo con medio mineral y 2-CF (22 mg C-2-CF/L). Ensayos con biomasa estéril (121°C por 1h), medio mineral, 2-CF (22mg C /L) y  $NO_3^-$  (22 mg N / L). Otros cultivos controles bióticos fueron llevados a cabo con lodo desnitrificante, medio mineral y acetato (100 mg C/L) y  $NO_3^-$  (83 mg N / L) (relación C/N estequiométrica cercana a 1.1), los cuales fueron usados como referencia de la capacidad desnitrificante del lodo. Finalmente, se llevaron a cabo ensayos con lodo desnitrificante, medio mineral y solo 2-CF (22mg C/L) o solo  $NO_3^-$  (22 mg N/L)

### **5.1.3.4 Ensayos cinéticos del consumo del 2-CF**

Se llevaron a cabo algunas series de experimentos: (1) Ensayos desnitrificantes conteniendo lodo desnitrificante, medio mineral, 2-CF (22 mg/L) y  $NO_3^-$  (22 mg N/L) (relación C/N estequiométrica de 1). (2) Ensayos con lodo desnitrificante, medio

mineral, 2-CF (22mg / L), NO<sub>3</sub> (22 mg N/L) y diferentes concentraciones de fenol (23, 46, 69 and 92 mg C/L) o acetato (60 and 108 mg C/L). Este rango de concentraciones probadas fue elegido para tener suficiente poder reductor.

Todos los cultivos en lote se llevaron a cabo por duplicado. Los valores obtenidos en todos los ensayos fueron representados con el promedio y el  $\pm$  de la desviación estándar. Cada botella fue una unidad experimental independiente y fue desechada después del muestreo. Las muestras líquidas y del espacio de cabeza fueron tomadas periódicamente para determinar la utilización de los sustratos y la formación de los productos. Todas las muestras fueron filtradas (0.45  $\mu$ m) antes del análisis.

#### **5.1.3.5 Métodos analíticos**

La concentración de 2-CF y fenol fue determinada usando cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, Perkin Elmer series 200, USA), equipado con una columna C-18 (Phenomenex, USA). La fase móvil fue acetonitrilo-agua (60:40 v/v) a 1.5 mL /min. El nitrato y nitrito fueron analizados por HPLC (Perkin Elmer Series 200, USA) a 214 nm usando una columna de intercambio iónico (IC-Pak Anion HC, Waters). La fase móvil fue una mezcla de una solución de borato-gluconato (20 mL), butanol (20 mL) and acetonitrilo (120 mL) diluido a 1 L. La composición de la solución borato-gluconato fue la siguiente (g/L): gluconato de sodio (16), ácido bórico (18), tetraborato de sodio decahidratado (25) and glicerol (315). La velocidad del flujo fue de 2 mL/min. La composición del gas en el espacio de cabeza (N<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>) fue cuantificada por cromatografía de gases (Varian 3350, USA) mediante un detector de conductividad térmica y una columna de acero empacada (Poropak Q Mesh 80-100). Las temperaturas de la columna, inyector y detector fueron de 50, 100 y 100<sup>o</sup> C, respectivamente. El flujo del gas acarreador (He) fue de 16 mL/min. La concentración de acetato fue cuantificada por cromatografía de gases (Hewlett Packard 5890, USA (Martínez-Hernández y col. 2009)). El carbón orgánico y carbono inorgánico fueron medidos usando un analizador de

carbono total (TOC) (Shimadzu, TOC-VCSN, Japan). Los sólidos suspendidos volátiles (SSV, SST) fueron determinados de acuerdo a métodos estándares (APHA, 1998).

#### **5.1.3.6 Variables de respuesta**

El proceso fue evaluado a través de eficiencias de consumo ( $E$ , mg sustrato consumido/mg de sustrato alimentado\* 100), rendimientos ( $Y$ , mg de producto / mg de sustrato consumido) y velocidades específicas de consumo de sustrato y formación de producto ( $q$ , mg sustrato consumido o producto formado/g SSV d). El cálculo de las velocidades específicas se hizo mediante una regresión lineal de los datos experimentales ( $r^2 > 0.95$ ).

### **5.1.4 Resultados y discusión**

#### **5.1.4.1 Ensayos control**

Se realizaron pruebas abióticas con medio mineral y 2-clorofenol, en presencia y ausencia de la luz natural, no hubo un cambio significativo en la concentración del 2-clorofenol en un periodo de 42 d (Tabla 5.1.1), ya que el coeficiente de variación (C.V.) fue menor que 6%. Por lo que se puede decir que no hay pérdida del 2-clorofenol por posibles reacciones químicas con algún componente del medio de cultivo. Por otro lado, se realizaron pruebas abióticas con biomasa estéril  $0.5 \pm 0.04$  g SSV/L, la cual se esterilizó a  $121$  °C y  $15$  lb/pul<sup>2</sup> durante 1 hora. Como se observa en la Tabla 5.1.1, la concentración de 2-Clorofenol se mantuvo constante con un promedio de  $36.19 \pm 1.84$  mg/L. Por lo anterior podemos decir, que no hubo pérdida significativa del 2-clorofenol por adsorción sobre la biomasa. Lo anterior concuerda con los estudios realizados por Beristain-Montiel y col. (2010), en donde observan pérdidas menores del 5% tanto para interacción química como por adsorción en la biomasa estéril.

**Tabla 5.1.1** Pruebas abióticas en presencia y ausencia de luz y adsorción en biomasa estéril

	<b>C-2-CF (mg/L)</b>	<b>Coefficiente de variación (%)</b>
Luz	23.56 ± 0.84	3.43
S / Luz	23.18 ± 1.06	4.56
Biomasa estéril	20.26 ± 1.01	4.41

Para comprobar la actividad desnitrificante del inóculo se realizó un ensayo control utilizando acetato como donador de electrones. El lodo desnitrificante llevó a cabo el consumo completo del acetato y nitrato después de 15 h ( $E_{\text{acetato}}$  y  $E_{\text{NO}_3^-}$  de 100%). Mientras que, los valores de  $Y_{\text{HCO}_3^-}$  y de  $Y_{\text{N}_2}$  fueron de  $0.71 \pm 0.06$  (mg C- $\text{HCO}_3^-$  /mg de C-acetato consumido) y  $0.52 \pm 0.01$  (mg  $\text{N}_2$  /mg N-Nitrato consumido), respectivamente. Las velocidades específicas de consumo fueron de  $168.24 \pm 1.5$  mg C-acetato/ (g SSV d) y  $140.64 \pm 0.3$  mg N- $\text{NO}_3^-$  / (g SSV d). Los resultados indicaron que el lodo mostró una actividad desnitrificante sobre las condiciones experimentales usadas en el ensayo.

Posteriormente, se realizaron ensayos cinéticos con biomasa activa en presencia de 2-CF (22 mg C-2-CF/L) o nitrato solamente (22 mg N- $\text{NO}_3^-$ /L); en la Tabla 5.1.2 se muestran los resultados. Se observó que una fracción de 2-CF (12%) así como de nitrato (98%) se consumió después de 14 d en ausencia de un donador o aceptor de electrones. La cinética se siguió hasta el día 100, mostrando el mismo comportamiento. Estos resultados sugirieron que el consumo tanto del 2-CF como de nitrato puede estar ligado al metabolismo endógeno. Este consumo puede estar relacionado a la utilización de sustratos endógenos, como sustancias exopoliméricas presentes en el lodo

desnitrificante, donde la fracción de carbohidratos puede ser usada como fuente de electrones (Lapidou y Ritmann, 2002)

**Tabla 5.1.2** Controles bióticos y ensayo estequiométrico en cultivo lote, los valores fueron calculados a 14 d de cultivo

<b>Ensayos</b>	<b>E<sub>2-CF</sub></b> (%)	<b>E<sub>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></sub></b> (%)	<b>q<sub>2-CF</sub></b> (mg C-2-CF/g SSV d)	<b>q<sub>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></sub></b> (mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /g SSV d)
2-CF (solo)	11.6 ± 4.2	-	0.21 ± 0.02	_____
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (solo)	_____	98.1 ± 2.7	_____	15.74 ± 1.39
2-CF + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	9.8 ± 1.1	95.6 ± 5.2	0.27 ± 0.06	16.29 ± 0.71

#### **5.1.4.2 Consumo de 2-CF a una relación C/N estequiométrica.**

Cuando los cultivos con concentraciones estequiométricas de 2-CF y nitrato fueron probados, la velocidad específica de consumo del 2-CF fue 60 veces más baja que la de nitrato. Las eficiencias de consumo y las velocidades específicas de consumo fueron similares a las obtenidas en los ensayos con solo el 2-CF o solo nitrato (Tabla 5.1.2). Estos resultados sugieren que ambos, 2-CF y nitrato, fueron consumidos a través del metabolismo endógeno. En este sentido, Becker y col (2006) observaron que, en condiciones anaerobias, los sustratos endógenos son metabolizados primero en presencia de sustratos de lento consumo. Se encontró que, sobre estas condiciones estequiométricas, la  $q_{2-CF}$  fue 600 veces más baja que la  $q_{acetato}$ , mostrando que el 2-CF es un compuesto altamente recalcitrante bajo condiciones desnitrificantes. Estos resultados mostraron también que la adición de nitrato en los cultivos no mejoró el consumo de 2-CF. De esta manera, se puede decir, que bajo estas condiciones experimentales, no fue posible discernir si el lodo desnitrificante fue capaz de consumir el 2-CF por

desnitrificación. Resultados similares fueron obtenidos por Häggblom y col. (1993) y Sanford y Tiedje (1997), donde no fue posible establecer que el consumo del compuesto fenólico estuviera asociado a la reducción de nitrato por desnitrificación.

Por otro lado, ha sido reportado que la descloración reductiva puede ser el paso inicial en el metabolismo de compuestos clorados (Fetzner 1998, Vallecillo y col. 1999; Field y Sierra-Alvarez 2008). Sanford y Tiedje (1997) propusieron que sobre condiciones desnitrificantes, el consumo del 2-CF se inicia por la reducción del 2-CF a fenol y requiere de la adición de un donador de electrones como el acetato para iniciar el proceso de deshalogenación. También ha sido sugerido que la adición de fuentes de carbono fácilmente oxidables pueden mejorar el consumo de compuestos recalcitrantes (Dietrich y Winter, 1990; Martínez-Hernández y col., 2009). Para tener un mejor entendimiento acerca de cómo el consumo de 2-CF se podría mejorar sobre condiciones desnitrificantes, utilizando fuentes alternas de carbono, el fenol y acetato fueron probados como cosustratos. Ambos compuestos pueden ser usados como donadores de electrones en la descloración del 2-CF. Además, el fenol fue elegido porque puede ser uno de los intermediarios de la vía de consumo del 2-CF, mientras que el acetato es una fuente de carbono fácilmente oxidable.

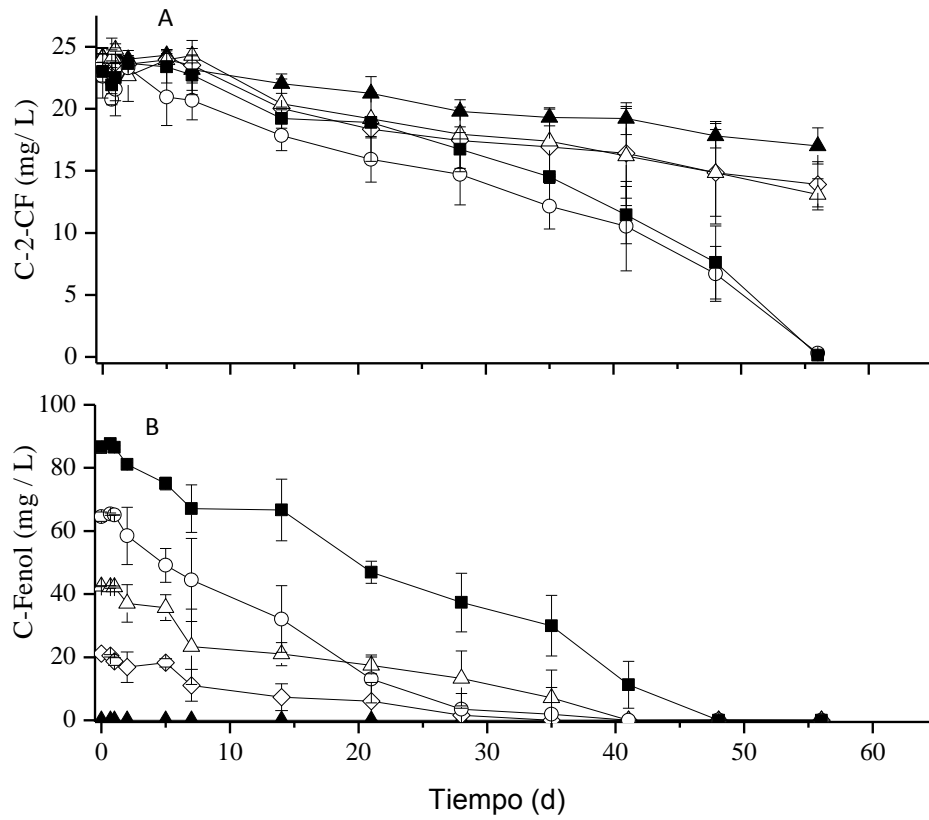
#### ***5.1.4.3 Efecto del fenol sobre el consumo del 2-clorofenol.***

Se realizaron ensayos preliminares usando la concentración de fenol estequiométrica (1.6 mg de C-fenol/L) para reducir el 2-CF (22 mg C-2-CF/L) a fenol. Se asumió que el fenol producido se acoplaría a la reducción de nitrato (22 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L) a N<sub>2</sub>. Sin embargo, solo fue eliminado el 9.7% de 2-CF en 14 d de incubación. Consecuentemente, se decidió usar concentraciones más altas que la concentración estequiométrica (23, 46, 69 y 92 mg C/L) (Figura 5.1.1). Como se muestra en la Figura 5.1.1 A, la adición de fenol provocó un incremento en el consumo del 2-clorofenol por el lodo desnitrificante. En el intervalo de concentraciones de 23 a 92 mg C-Fenol /L, la E<sub>2-CF</sub>

se incrementó de 40.4 a 99.6%. De manera similar, la  $q_{2\text{-CF}}$  se incrementó cuando se aumentó la concentración de fenol (Tabla 5.1.3). A la concentración más alta de fenol empleada (92 mg C-Fenol/L), la  $q_{2\text{-CF}}$  fue 2.6 veces más alta que el valor obtenido en los ensayos sin fenol. Estas observaciones concuerdan con varios estudios realizados sobre condiciones aerobias y anaerobias en las cuales se mostró que la adición de fenol puede mejorar la eliminación de monoclorofenoles (Saéz y Rittmann, 1993; Wang y Loh, 2000; Beristain-Montiel, 2010). Sin embargo, de acuerdo con nuestro conocimiento, es el primer trabajo que reporta el efecto benéfico de la adición de fenol sobre el consumo del 2-clorofenol por un lodo desnitrificante. De acuerdo a Monsalvo y col., (2009) el fenol ha sido presentado como un mejor cosustrato que compuestos convencionales como azúcar o peptona porque éste favorece la remoción de clorofenoles, debido a su semejanza con la estructura química. Sin embargo, es necesario realizar más investigación para entender cómo el fenol puede contribuir al consumo de 2-clorofenol.

Utilizando un lodo metanogénico aclimatado a 2-clorofenol por 80 d en presencia de 41.3 mg de fenol /L (31.6 mg C-Fenol/L), Beristain-Montiel y col. (2010) reportaron que la  $q_{2\text{-CF}}$  fue de  $0.0044 \pm 0.0005$  mg C-2-CF/g SSV d, alrededor de 86 veces más bajo que el valor obtenido en nuestro trabajo con un lodo desnitrificante sin previa aclimatación a 2-clorofenol (la  $q_{2\text{-CF}}$  fue de  $0.38 \pm 0.10$  mg C-2-CF/g SSV d a 23 mg C-Fenol). Beristain-Montiel y col. (2010), no observaron una fase lag en el consumo del 2-clorofenol, mientras que en el presente trabajo, fue obtenida una fase lag de 5 d. Esta diferencia se puede deber al hecho de que lodo metanogénico fue previamente expuesto al 2-clorofenol. Sin embargo, estos resultados indican que el lodo desnitrificante mostró una alta velocidad para el consumo del 2-clorofenol y se podría sugerir que el uso de este lodo podría ser una buena alternativa para el consumo del 2-clorofenol.





**Figura 5.1.1.** Eliminación del 2-CF en presencia de diferentes concentraciones de fenol sobre condiciones desnitrificantes. 2-CF sin fenol (▲), 2-CF con 23 mg de C- fenol /L (◇), 2-CF con 46 mg de C-fenol/ L (△ ), 2-CF con 69 mg de C-fenol/ L (O) y 2-CF con 92 mg of C-fenol/ L (■).

En todos los casos, el fenol fue consumido después de 56 d ( $E_{\text{fenol}}$  del 100%) (Figura 5.1.1 B). De acuerdo con el balance de masa (Tabla 5.1.4), se observó que ambos, el 2-clorofenol y el fenol fueron oxidados a bicarbonato principalmente ( $Y_{\text{HCO}_3^-} = 0.9 \pm 0.09$ ). La formación de metano fue observada solo a 69 y 92 mg C-fenol / L con  $Y_{\text{CH}_4}$  de  $0.02 \pm 0.001$  y  $0.05 \pm 0.001$ , que corresponde a  $2.6 \pm 0.1$  y  $5.3 \pm 0.2$  mg C- $\text{CH}_4$  / L, respectivamente, mostrando que la metanogénesis no fue el proceso predominante sobre las condiciones experimentales probadas.

**Tabla 5.1.3** Variables de respuesta del proceso desnitrificante usando diferentes concentraciones del donador de electrones

<b>Fuente de Carbono (mg/L)</b>	<b>q<sub>2-CF</sub><sup>a</sup></b>	<b>q<sub>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></sub><sup>b</sup></b>	<b>C/N</b>
2-CF + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (ensayo estequiométrico)	0.27 ± 0.06	16.29 ± 0.7	1
Fenol (23) + 2-CF + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.38 ± 0.10	17.2 ± 1.54	2.11
Fenol (46) + 2-CF + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.4 ± 0.10	12.73 ± 5.80	3.18
Fenol (69) + 2-CF + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.68 ± 0.05	9.78 ± 1.90	3.46
Fenol (92) + 2-CF + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.7 ± 0.09	8.47 ± 0.09	3.96
Acetato (60) + 2-CF + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	2.16 ± 0.2	54 ± 1.83	3.37
Acetato (108) + 2-CF + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	2.48 ± 0.14	60.9 ± 8.10	5.41

<sup>a</sup>(mg C-2-CF/ g SSV d); <sup>b</sup>(mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ g SSV d)

**Tabla 5.1.4.** Balance de carbono y nitrógeno obtenido con un lodo desnitrificante a diferentes concentraciones de fenol en presencia de 2-clorofenol.<sup>a</sup>

Entrada (mg/L)			Salida (mg/L)					
C-fenol	C-2-CF	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	C-fenol	C-2-CF	C-HCO <sub>3</sub> <sup>-c</sup>	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	N-N <sub>2</sub>
0 <sup>b</sup>	24.1 ± 0.5	23.7 ± 0.3	0	17.8 ± 0.3	11.1 ± 0.9	0	0	23.2 ± 0.6
23 ± 2.1	23.5 ± 1.3	22.8 ± 1.2	0	14.0 ± 1.8	27.0 ± 0.6	0	0	21.9 ± 1.7
46 ± 1.5	24.1 ± 0.3	22.6 ± 0.2	0	13.0 ± 1.2	59 ± 3.1	0	0	22.3 ± 0.4
69 ± 2.6	22.6 ± 1.8	28 ± 2.0	0	0.3 ± 0.5	88.6 ± 5.0	0	0	27.6 ± 0.3
92 ± 1.5	23.0 ± 0.4	29 ± 0.1	0	0.1 ± 0.1	101.5 ± 5.3	0	0	28.1 ± 3.1

<sup>a</sup> El balance fue realizado a 56 d de cultivo.

<sup>b</sup> Ensayo estequiométrico

<sup>c</sup> El C-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> es la suma del carbono inorgánico soluble + CO<sub>2</sub>.

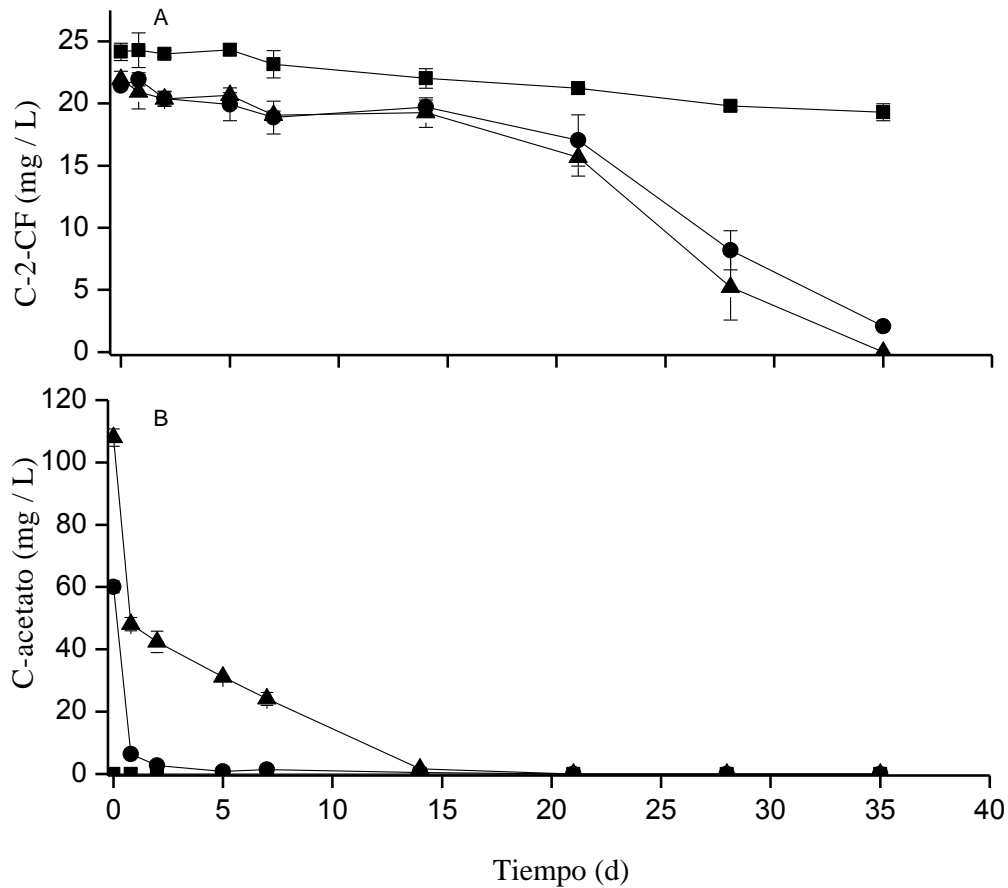
Como previamente se mencionó, en nuestras condiciones experimentales, la desnitrificación parece ser principalmente llevada a cabo por el metabolismo endógeno y no fue posible aportar evidencia de que la reducción del nitrato podría estar asociada al consumo del 2-clorofenol. Sin embargo, en ensayos realizados en ausencia de nitrato, con solo 2-clorofenol y fenol (92 mg C-fenol/L), se encontró que la  $q_{2\text{-CF}}$  fue de  $0.13 \pm 0.02$  mg 2-CF/g SSVd, que corresponde a un valor 5.5 veces más bajo que el obtenido en experimentos con 2-clorofenol, fenol y nitrato. Esto mostró que el nitrato podría estar involucrado en mejorar el consumo del 2-clorofenol. De manera similar, Genthner y col. (1989) observaron que el nitrato estimula la eliminación anaerobia del 3-clorobenzoato en sedimentos acuáticos. Además, Jianlong y col. (2001) usando bacterias desnitrificantes observaron que el consumo anaerobio del 4-chlorophenol fue dependiente de nitrato.

Como se muestra en Tabla 5.1.4, el nitrato consumido fue principalmente reducido a  $N_2$  ( $E_{NO_3^-}$  de 100% y  $Y_{N_2}$  de  $0.97 \pm 0.01$ ). En todos los casos, el nitrato fue consumido en los primeros 7 d de cultivo y el nitrito fue solo detectado como intermediario transitorio de la vía desnitrificante. Estos resultados mostraron que la desnitrificación fue la vía principal del consumo del nitrato.

#### ***5.1.4.4 Efecto del acetato sobre el consumo del 2-clorofenol.***

Así como en el ensayo del fenol, el acetato fue inicialmente adicionado a una concentración estequiométrica (1.9 mg C-acetato/L) para la reducción de 2-clorofenol (22 mg C-2-CF) a fenol, considerando que el fenol producido podría ser usado más tarde como donador de electrones para la reducción del nitrato (22 mg N- $NO_3^-$ ) a  $N_2$ . Sin embargo, bajo estas condiciones solo se consumió el 6.7% de la concentración inicial de 2-clorofenol después de 14 d. Así, que se probaron concentraciones más altas de acetato (60 y 108 mg C-acetato / L) para evaluar su impacto sobre el consumo de 2-clorofenol por el lodo desnitrificante (Figura 5.1.2). Independientemente de la concentración inicial

de acetato, el 2-clorofenol fue totalmente consumido ( $E_{2\text{-CF}}$  de  $94.7 \pm 5.3\%$ ) mientras que en ausencia de acetato la  $E_{2\text{-CF}}$  fue solo del  $20.1 \pm 2.0\%$ . La adición de acetato también provocó un incremento en la  $q_{2\text{-CF}}$  (hasta 9 veces) comparado con el control sin acetato (Tabla 5.1.3). Así como el fenol, el acetato mejoró el consumo del 2-clorofenol por el lodo desnitrificante, incrementando ambos la  $E_{2\text{-CF}}$  y la  $q_{2\text{-CF}}$ .



**Figura 5.1.2.** Eliminación del 2-CF en presencia de diferentes concentraciones de acetato sobre condiciones desnitrificantes. (◆) 2-CF con 60mg/L de C-acetato, (■) 2-CF 108 mg/L de acetato

El consumo total de acetato fue llevado a cabo en menos de 15 d (Figura 5.1.2 B). El balance mostró que ambos, acetato y 2-CF fueron eficientemente consumidos ( $E_{\text{acetato}}=100\%$  y  $E_{2\text{-CF}}= 94.7 \pm 5.3$ ) y mineralizado a bicarbonato con valores de  $Y_{\text{HCO}_3^-}$  de  $0.99 \pm 0.05$  a 60 mg C-acetato/L y  $0.8 \pm 0.02$  a 108 mg C-acetato / L (Tabla 5.1.5). En

ambos casos, el nitrato fue consumido durante los dos primeros días. Como el nitrato fue principalmente transformado a  $N_2$  ( $E_{NO_3^-} = 100\%$ ,  $Y_{N_2} = 0.94 \pm 0.02$ ), se puede establecer que la desaparición de nitrato fue por desnitrificación. El metano no fue detectado a 60 mg C-acetato/L mientras que a 108 mg C-acetato/L el  $Y_{CH_4}$  fue de  $0.19 \pm 0.02$  (la concentración de C-metano fue de  $24.6 \pm 0.1$  mg/L). Estos resultados indicaron que bajo estas condiciones, la metanogénesis pudo ser causada por la adición de acetato (en exceso), la desnitrificación sería todavía el principal proceso involucrado en la mineralización de 2-clorofenol y acetato, evidenciando que el acetato fue usado como el donador de electrones para la deshalogenación del 2-clorofenol a fenol.

Para comparar los resultados entre los experimentos de fenol y acetato, las concentraciones iniciales del cosustrato fueron convertidas a equivalentes reductores. La concentración de acetato de 60 y 108 mg C/L (20 y 36 miliequivalentes de electrones/L) pueden ser comparados con las concentraciones de fenol de 46 y 92 mg C/L (18 y 36 miliequivalentes de electrones/L) en términos de equivalentes de electrones, respectivamente. A  $19 \pm 1$  miliequivalentes de electrones/L de acetato (60 mg C/L) y fenol (46 mg C/L), la  $E_{2-CF}$  fue de 89.4 y 27.9 %, respectivamente después de 35 d de cultivo. Similarmente, en la misma concentración inicial de cosustrato de 36 miliequivalentes de electrones / L, la  $E_{2-CF}$  fue 3 veces más alta con acetato (108 mg C/L) que el observado con fenol (92 mg C/L). La Tabla 5.1.3 indica que la  $q_{2-CF}$  fue más alta (hasta 5.4 veces) cuando el acetato fue adicionado en los cultivos. Por ejemplo, a 60 mg C-acetato/L y 46 mg C-fenol/L (ambas concentraciones corresponden a  $19 \pm 1$  miliequivalentes/L), la  $q_{2-CF}$  fue de  $2.16 \pm 0.02$  y  $0.4 \pm 0.1$  mg C-2-CF/g SSV d, respectivamente. Estos resultados indicaron que el acetato fue un mejor cosustrato que el fenol para mejorar el consumo del 2-clorofenol. El acetato es un sustrato de fácil oxidación comparado con el compuesto fenólico y este puede ser la razón por lo cual el acetato provoca un mayor efecto sobre el consumo del 2-clorofenol. Martínez-Hernández y col. (2009) observaron un papel similar del acetato en la oxidación del tolueno por desnitrificación, proponiendo que el acetato puede mejorar el crecimiento de las

poblaciones microbianas y actuar como un potenciador bioquímico. Tarighian y col. (2003) reportaron que ambos glucosa y fenol pueden ser usados como cosustratos de crecimiento para la biodegradación cometabólica del 4-clorofenol (4-CF), sin embargo, observaron que cuando se utilizó glucosa no se presentó la fase lag en el consumo del 4-CF, igualmente, la  $q_{2-CF}$  fue más alta que cuando se utilizó fenol. En contraste, Lee y Lee (2007) mostraron que la adición de fenol como un sustrato de crecimiento fue preferible sobre la adición de glucosa, ya que mejora la transformación del 4-CF. Estos resultados sugieren que varios factores como el tipo y concentración de cosustrato, el origen e historia del inóculo pueden influir en los efectos de los cosustratos sobre el consumo de los monoclorofenoles. Estudios futuros son requeridos para tener un mejor entendimiento de los efectos de los cosustratos sobre la biotransformación de compuestos aromáticos recalcitrantes como los clorofenoles.

**Tabla 5.1.5.** Balance de masa de carbono y nitrógeno obtenido con un lodo desnitrificante a diferentes concentraciones de acetato en presencia de 2-CF.<sup>a</sup>

Entrada (mg/L)			Salida (mg/L)						
C-acetato	C-2-CF	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	C-acetato	C-2-CF	C-Fenol	C-HCO <sub>3</sub> <sup>-c</sup>	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	N-N <sub>2</sub>
0 <sup>b</sup>	24.1 ± 0.5	23.7 ± 0.3	0	17.8 ± 0.3	0	11.1 ± 0.9	0	0	23.2 ± 0.6
60 ± 1.3	21.2 ± 1.1	22.3 ± 1.2	0	2.1 ± 0.1	10.1 ± 1.1	71.3 ± 0.9	0	0	21.3 ± 1.1
108 ± 1.2	22.1 ± 1.2	23.8 ± 1.9	0	0	8 ± 3	99.2 ± 1.1	0	0	22.1 ± 2

<sup>a</sup> El balance fue realizado a 35 d de cultivo.

<sup>b</sup> Ensayo estequiométrico.

<sup>c</sup> El C- HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> es la suma del carbono inorgánico soluble + CO<sub>2</sub>.



### 5.1.5 Conclusiones

La adición de acetato o fenol aumenta el consumo del 2-CF por el lodo desnitrificante, obteniendo valores superiores para la  $E_{2\text{-CF}}$  y  $q_{2\text{-CF}}$  comparados con el control sin cosustratos. También, se observa que el acetato fue mejor cosustrato que el fenol con valores más altos para la  $E_{2\text{-CF}}$  (hasta 3 veces) y  $q_{2\text{-CF}}$  (hasta 5.4 veces) cuando el acetato fue adicionado. Las eficiencias de consumo de los sustratos ( $E_{2\text{-CF}}$ ,  $E_{\text{fenol}}$ ,  $E_{\text{acetato}}$ ,  $E_{\text{NO}_3^-}$ ) fueron cercanas al 100%, obteniendo como productos principales del proceso al bicarbonato y  $\text{N}_2$  ( $Y_{\text{HCO}_3^-}$  of  $0.90 \pm 0.10$  y  $Y_{\text{N}_2}$  of  $0.96 \pm 0.02$ ). El lodo desnitrificante fue capaz de mineralizar simultáneamente al 2-CF, fenol o acetato, y reducir el nitrato a  $\text{N}_2$ . Estos resultados contribuyen a tener un mejor entendimiento del consumo del 2-CF por el proceso desnitrificante y podrían ser útiles para desarrollar propuestas adecuadas para la eliminación del 2-CF en sitios contaminados.

### 5.1.6 Bibliografía

- APHA. (1998). Standard methods for examination of water and wastewater (20th edn). American Public Health Association, Washintong, DC.
- Bae H.-S., Yamagishi T., Suwa Y. (2002). Evidence for degradation of 2-chlorophenol by enrichment cultures under denitrifying conditions. *Microbiology* **148**, 221-227.

- Basu, S.K. Oleszkiewicz, J.A., Sparling R. (2005). Effect of sulfidogenic and methanogenic inhibitors on reductive dehalogenation of 2-chlorophenol. *Environ. Technol.* **26**, 1383-1392.
- Becker, J., Berardesco, G., Rittmann, B., Stahl, D. (2006). Effects of endogenous substrate on adaptation of anaerobic microbial communities to 3-chlorobenzoate. *Appl Environ. Microbiol.* **72**, 449-456.
- Beristain-Montiel L., Gómez-Hernández J., Morroy-Hermosillo O., Cuervo-López F., Ramírez-Vives F. (2010). Methanization and mineralization of 2-chlorophenol by anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.* **62**, 1791-1798.
- Chang, C.-C., Tseng, S.-K. Chang, C.-C., Ho, C.-C. (2004), Degradation of 2-chlorophenol via a hydrogenotrophic biofilm under different reductive conditions. *Chemosphere* **56**, 989-997.
- Dietrich, G., Winter, J. (1990). Anaerobic degradation of chlorophenol by an enrichment culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 253-258.
- Downs T., Cifuentes-García E., Suffet I. (1999). Risk screening for exposure to groundwater pollution in wastewater irrigation district of the Mexico City region. *Environ. Health Perspect.* **107**, 553-562.
- Fakhrudin, A., Quilty, B. (2005). The influence of glucose and fructose on degradation of 2-chlorophenol by *Pseudomonas putida* CP1. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 1541-1548.
- Farrel, A., Quilty, B. (1999). Degradation of mono-chlorophenols by mixed microbial community via meta-cleavage pathway. *Biodegradation* **10**, 353-362.
- Farrel, A., Quilty, B. (2002). The enhancement of 2-chlorophenol degradation by a mixed microbial community when augmented with *Pseudomonas putida* CP1. *Water Res.* **36**, 2443-2450.

- Fava, F., Armenante, P.M., Kafkewitz, D. (1995). Aerobic degradation and dechlorination of 2-chlorophenol, 3-chlorophenol and 4-chlorophenol by a *Pseudomonas pickettii* strain. *Lett. Appl. Microbiol.* **21**, 307–312.
- Fetzner S. (1998). Bacterial dehalogenation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 633-657.
- Field, J., Sierra-Alvarez, R. (2008). Microbial degradation of chlorinated phenols, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **7**, 211-241.
- Genthner, B.R.S., Price II, W.A., Pritchard, P.H. (1989). Anaerobic degradation of chloroaromatic compounds in aquatic sediments under a variety of enrichment conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1466-1471.
- Gibson, S., Suflita, J. (1986). Extrapolation of biodegradation results to groundwater aquifers: reductive dehalogenation of aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 681-688.
- Hägglom, M., Rivera, M., Young, L. (1993). Influence of alternative electron acceptors on anaerobic biodegradability of chlorinated phenols and benzoic acids. *Appl Environ Microbiol* **59**, 1162-1167.
- Jianlong, W., Horan, N., Stentiford E.D., Yi, Q. (2001). Anaerobic degradation of 4-chlorophenol under conditions with nitrate as the only electron acceptor. *Toxicol. Environ. Chem.* **80**, 209-216.
- Kafkewitz, D., Fava, F., Armenante, P.M. (1996). Effect of vitamins on the aerobic degradation of 2-chlorophenol, 4-chlorophenol, and 4-chlorobiphenyl. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**, 414-421.
- Laspidou, C.S., Rittmann B.E. (2002). A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass, *Water Res.* **36**, 2711-2720.

- Lee, C.-Y., Lee, Y.-P., (2007). Degradation of 4-chlorophenol by enriched mixed cultures utilizing phenol and glucose as added substrate. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 383-391.
- Martínez-Hernández, S., Olguín, E., Gómez, J., Cuervo-López, F. (2009). Acetate enhances specific consumption rate of toluene under denitrifying conditions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **57**, 679-687.
- Mohn, H., Puhakka, J.A., Ferguson J.F (1999) Effects of electron donors on degradation of pentachlorophenol in a methanogenic fluidized bed reactor. *Environ. Technol.* **20**, 909-920.
- Monsalvo, V.M., Mohedano, A.F., Casas, J.A., Rodríguez, J. (2009). Cometabolic biodegradation of 4-chlorophenol batch reactors at different temperatures. *Bioresour. Technol.* **100**, 4572-4578.
- Puhakka, J.A., Herwig, R.P., Koro, P.M., Wolfe, G.V., Ferguson, J.F. (1995). Biodegradation of chlorophenols by mixed and pure cultures from a fluidized-bed reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 951-957.
- Saéz, P.B., Rittmann, B.E. (1993). Biodegradation kinetics of a mixture containing a primary substrate (phenol) and an inhibitory co-metabolite (4-chlorophenol). *Biodegradation* **4**, 3-21.
- Sanford, R., Tiedje, J. (1997). Chlorophenol dechlorination and subsequent degradation in denitrifying microcosms fed low concentrations of nitrate. *Biodegradation* **7**, 425-434.
- Seidler, J.J., Landau, M., Dierberg, F.E., Pierce, R.H. (1986). Persistence of pentachlorophenol in wastewater-estuarine aquaculture system. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **36**, 101-108.
- Schmidt, E., Hellwig, M., Knackmus, H.-J. (1983). Degradation of chlorophenols by a defined mixed microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 1038-1044.

- Tarighian, A., Hill, G., Headley, J., Pedras, S. (2003). Enhancement of 4-chlorophenol biodegradation using glucose. *Clean Techn. Environ. Policy*. **5**, 61-65.
- Valo, R., Kitunen, V., Salkinoja-Salonen, M., Räsänen, S. (1984). Chlorinated phenols as contaminants of soil and water in the vicinity of two Finnish sawmills. *Chemosphere* **13**, 835 – 844.
- Vallecillo, A., Garcia-Encina, P.A., Peña, M. (1999). Anaerobic biodegradability and toxicity of chlorophenols. *Wat. Sci. Technol.* **40**, 161-168.
- Wang, S.J., Loh, K.C. (2000). New cell growth pattern on mixed substrates and substrate utilization in cometabolic transformation of 4-chlorophenol. *Water Res.* **34**, 3786–3794.

## **5.2 Eliminación del 2-clorofenol en presencia de diferentes donadores de electrones utilizando un lodo estabilizado sin previa exposición a compuestos fenólicos.**

### **5.2.1 Resumen**

Los clorofenoles son compuestos tóxicos de lento consumo en condiciones anaerobias. La adición de donadores de electrones se ha utilizado para mejorar su consumo, aunque no hay información suficiente que sugiera cómo se lleva cabo el proceso. El objetivo de este estudio fue evaluar y analizar en ensayos en lote, el efecto de diferentes concentraciones de distintos donadores de electrones (acetato, fenol o glucosa) sobre la eficiencia y velocidad de consumo del 2-clorofenol (2-CF) en condiciones anaerobias, utilizando un lodo desnitrificante producido en continuo en régimen estacionario. Se llevó a cabo un cultivo control con 2-CF en ausencia de donador de electrones. La adición de fenol incrementó la eficiencia de consumo de 2-CF hasta 53.3%, pero tanto el fenol como el clorofenol persistieron en el cultivo. La glucosa aumentó la eficiencia hasta 97.8% y la velocidad específica de consumo de 2-CF fue hasta 3 veces más alta con respecto al control. El acetato incrementó la eficiencia hasta un 98.6 % y la velocidad específica de consumo de 2-CF hasta 8.4 veces, con relación al control. Los resultados sugieren que el donador de electrones determina los valores de la eficiencia, rendimiento y velocidades específicas y no dependen de la semejanza de la estructura química del donador de electrones con el 2-CF, siendo el tipo de sustrato el factor que más impactó en la cinética y el metabolismo del lodo comparado con la concentración del sustrato.

Palabras clave: ***2-clorofenol; glucosa, acetato, fenol***

### **5.2.2 Introducción**

Los clorofenoles pertenecen al grupo denominado compuestos orgánicos halogenados que constituyen uno de los grupos más grandes y dispersos en el ambiente. Son el resultado de las descargas de aguas residuales generadas de las actividades

agrícolas por el uso de pesticidas y herbicidas y de actividades industriales, como la de la pulpa y el papel, tintes, colorantes, y farmacéutica, principalmente (Hägglom y Bossert, 2003). Sin embargo, se ha encontrado que también son producidos naturalmente por algunas bacterias (Milliken y col., 2004). Los clorofenoles son recalcitrantes y posiblemente estén relacionados con problemas tóxicos y de la salud (Vallecillo y col., 1999), por tal motivo, han sido clasificados como contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental (ATSDR, 2007). Se ha observado que las descargas inadecuadas de las aguas residuales podrían generar diversos problemas ecotoxicológicos con consecuencias serias para los organismos vivos, de ahí la importancia de contar con alternativas que permitan su eliminación del ambiente.

La eliminación biológica de los clorofenoles ha sido estudiada tanto en condiciones aerobias (Farrel y Quilty, 1999; Loh y Wang, 2006, Buitrón y Andrade, 2011), como anaerobias (Dietrich y Winter., 1990; Hägglom y col., 2000). En condiciones anaerobias la mayoría de la información disponible se ha generado bajo en condiciones metanogénicas (Takeuchi y col., 2000; Bajaj y col., 2008; Beristain-Montiel y col., 2012). Bajo estas condiciones se ha observado que la transformación de los clorofenoles consta de una serie de pasos sucesivos de descloración reductiva hasta la descloración completa del compuesto, seguida por el rompimiento del anillo aromático y termina con la formación de metano y CO<sub>2</sub> (Boyd y Shelton, 1984; Dietrich y col., 1990). Algunos estudios han mostrado que la transformación de los clorofenoles policlorados en ocasiones resulta en la acumulación de clorofenoles menores como el 2-CF (Armenante y col., 1993; Mohn y col., 1999; Garibay-Orijel y col., 2006).

Se ha sugerido que la recalcitrancia de los clorofenoles se puede deber a la fuerte estabilidad que le confiere el enlace carbono-halógeno a la molécula (Farrel and Quilty, 2002). También, se ha mencionado que la aclimatación del inóculo puede mejorar el consumo de los clorofenoles (Moreno y Buitrón 2004). Por ejemplo, Lanthier y col., 2004, reportaron eficiencias de eliminación hasta del 60 % del pentaclorofenol, después de 225 días de aclimatación. Por su parte Beristain-Montiel y col., (2010) observaron que al

poner al lodo en contacto previo con el 2-CF se incrementó la velocidad específica de consumo del 2-CF de 0.0014 a 0.003 (mg C-clorofenol / g SSV d), sin embargo, la eficiencia de eliminación no se mejoró, pero se mantuvo alta. Hay otros estudios, que mencionan que la adición de donadores de electrones externos podrían disminuir los efectos tóxicos de los clorofenoles, mejorando su eficiencia de consumo (Monh y col. 1999., Atuanya y Chakrabarti, 2003). Ye y col. (2004) observaron que la velocidad de degradación fue más alta en presencia de sacarosa que en su ausencia (0.08 y 0.38 mg/L d en ausencia y en presencia de sacarosa, respectivamente). Sin embargo, aún no está claro cómo afecta la concentración y tipo de donador en este proceso en términos de variables de respuesta como eficiencia o velocidad de consumo del clorofenol. El objetivo de este estudio fue evaluar en ensayos en lote el efecto de diferentes concentraciones de distintos donadores de electrones (acetato, fenol o glucosa) sobre la eficiencia y velocidad de consumo del 2-CF en condiciones anaerobias por un lodo no aclimatado a compuestos fenólicos.

### 5.2.3 Material y métodos

#### 5.2.3.1 Inóculo

El inóculo utilizado en los cultivos en lote fue obtenido en condiciones desnitrificantes de un reactor anaerobio de cama de lodos de flujo ascendente (UASB, upflow anaerobic sludge blanket) de 1.4 L de volumen de trabajo alimentado con acetato como fuente de carbono (0.8 g C-acetato/L). La composición del medio mineral (MM) fue la siguiente (g/L):  $K_2HPO_4$  (3),  $MgSO_4$  (0.03),  $NaNO_3$  (2.42). Los elementos traza fueron adicionados para tener la siguiente concentración final (mg/L):  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (7.5),  $Na_2MoO_4 \cdot H_2O$  (1),  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  (70),  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (7),  $MnCl_2$  (5). El sistema fue operado durante 5 meses en estado estacionario a 30 °C y con un tiempo de residencia hidráulico de 2 d. Bajo estas condiciones, las eficiencias de consumo de carbono y de nitrógeno fueron de 95.87 %  $\pm$  3 y 98.91 %  $\pm$  3.5 respectivamente. El  $Y_{HCO_3^-}$  fue de  $0.95 \pm 0.04$  g  $C-HCO_3^-$  / (g C-orgánico consumido) y el  $Y_{N_2}$  fue de  $0.79 \pm 0.042$  g  $N_2$  / (g  $N-NO_3^-$ ). El inóculo



obtenido del reactor UASB fue previamente centrifugado a 4000 g por 10 min y lavado tres veces con una solución de NaCl (9 g/L) antes de ser utilizado en los cultivos en lote.

### **5.2.3.2 Cultivos en lote**

Los ensayos fueron conducidos en botellas serológicas de 545 mL con un volumen de trabajo de 400 mL. El MM utilizado en todos los ensayos fue el siguiente (g/L):  $K_2HPO_4$  (0.72),  $KH_2PO_4$  (0.27),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.03),  $NaHCO_3$  (0.026). Los elementos traza fueron adicionados para tener la siguiente concentración final (mg/L):  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (7.5),  $Na_2MoO_4 \cdot H_2O$  (1),  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  (70),  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (7),  $MnCl_2$  (5). Las botellas fueron selladas con tapas de goma y con contratapas de aluminio y oxígeno presente en el espacio de cabeza fue reemplazado con una corriente de He durante 10 min.

### **5.2.3.3 Ensayos en lote con diferentes donadores de electrones**

Se llevaron a cabo los siguientes ensayos: (1) Se realizaron ensayos abióticos en ausencia del lodo con MM y 2-CF (22.4 mg C/L) y así como ensayos con biomasa estéril (121°C por 1 hora), MM y 2-CF (22.4 mg C/L), (2) un cultivo control biótico conteniendo lodo desnitrificante, MM y 2-CF (22.4 mg C/L) sin la adición de un donador de electrones. (3) ensayos con lodo desnitrificante, MM, 2-CF (22.4 mg C/L) y diferentes concentraciones (77.6, 127.6 y 177.6 mg de C/L) de acetato, glucosa o fenol como donadores de electrones.

Todos los ensayos fueron llevados a cabo por duplicado. Cada botella representa una cinética y los valores obtenidos en todos los ensayos están representados como el valor promedio  $\pm$  la desviación estándar. Muestras líquidas y del espacio de cabeza fueron tomadas periódicamente para ser analizadas y determinar la concentración de sustratos y formación de productos. Las muestras fueron filtradas antes de ser analizadas utilizando una membrana de 0.45  $\mu$ m.

#### **5.2.3.4 Métodos analíticos**

La concentración de 2-CF y fenol fue determinada usando cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, Perkin Elmer series 200, USA), equipado con una columna C-18 (Phenomenex, USA). La fase móvil fue acetonitrilo-agua (60:40 v/v) a 1.5 mL /min. La composición del gas en el espacio de cabeza (CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>) fue cuantificada por cromatografía de gases (Varian 3350, USA) mediante un detector de conductividad térmica y una columna de acero empacada (Poropak Q Mesh 80-100). Las temperaturas de la columna, inyector y detector fueron de 50, 100 y 100° C, respectivamente. El flujo del gas acarreador (He) fue de 16 mL/ min. La concentración de la glucosa fue determinada mediante el analizador bioquímico YSI 2700 (YSI Inc), utilizando la membrana YSI 2365. La concentración de acetato fue cuantificada por cromatografía de gases (Hewlett Packard 5890, USA (Martínez-Hernández y col. 2009)). El carbono orgánico y carbono inorgánico fueron medidos usando un analizador de carbono total (TOC) (Shimadzu, TOC-VCSN, Japan). Los sólidos suspendidos volátiles (SSV, SST) fueron determinados de acuerdo a métodos estándares (APHA, 1998).

#### **5.2.3.5 Variables de respuesta**

El proceso fue evaluado a través de eficiencias de consumo (E, mg sustrato consumido/mg de sustrato alimentado\* 100), rendimientos (Y, mg de producto/mg de sustrato consumido) y velocidades específicas de consumo de sustrato y formación de producto (q, mg sustrato consumido o producto formado/g SSV d). El cálculo de las velocidades específicas se hizo mediante una regresión lineal de los datos experimentales ( $r > 0.95$ ).

### **5.2.3 Resultados y discusión**

En los controles abióticos y bióticos estériles se obtuvo que la diferencia entre la concentración final y la inicial fue menor al 6%. De esta manera, se puede decir que no hubo pérdidas significativas por volatilización, reacción química o adsorción. En el

ensayo control con solo 2-CF, sin adición de una fuente de electrones externa, se obtuvo una eficiencia de consumo del compuesto fenólico de  $28.4 \% \pm 0.2$  después de 48 d de cultivo y la  $q_{2\text{-CF}}$  fue de  $0.32 \pm 0.04$  mg C-2-CF/g SSV d (Tabla 5.2.1).

**Tabla 5.2.1.** Eficiencias y velocidades específicas de consumo del 2-CF (22.4 mg /L) y rendimientos de bicarbonato a diferentes concentraciones de acetato, fenol o glucosa.

Fuente de Carbono (mg/L)	$q_{2\text{-CF}}^a$	$E_c$	$Y_{\text{HCO}_3^-}^b$
2-CF (solo)	$0.32 \pm 0.04$	$28.4 \pm 0.2$	N.D.
Fenol (77.6) + 2-CF	$0.55 \pm 0.03$	$33.8 \pm 0.5$	$0.73 \pm 0.03$
Fenol (127.6) + 2-CF	$0.69 \pm 0.17$	$52.85 \pm 2.5^c$	$0.76 \pm 0.13$
Fenol (177.6) + 2-CF	$0.81 \pm 0.13$	$53.34 \pm 1.4.7$	$0.69 \pm 0.41$
Acetato (77.6) + 2-CF	$0.89 \pm 0.4$	$79.9\% \pm 12.5$	$0.81 \pm 0.08$
Acetato (127.6) + 2-CF	$2.7 \pm 0.42$	$98.6\% \pm 1.9$	$0.65 \pm 0.01$
Acetato (177.6) + 2-CF	$2.54 \pm 0.16$	$92.5 \pm 1.5$	$0.62 \pm 0.03$
Glucosa (77.6) + 2-CF	$0.9 \pm 0.09$	$97.8 \% \pm 0.57$	$0.47 \pm 0.09$
Glucosa (127.6) + 2-CF	$0.96 \pm 0.03$	$96.6 \% \pm 0.03$	$0.59 \pm 0.03$
Glucosa (177.6) + 2-CF	$0.86 \pm 0.16$	$85.03\% \pm 11.2$	$0.42 \pm 0.03$

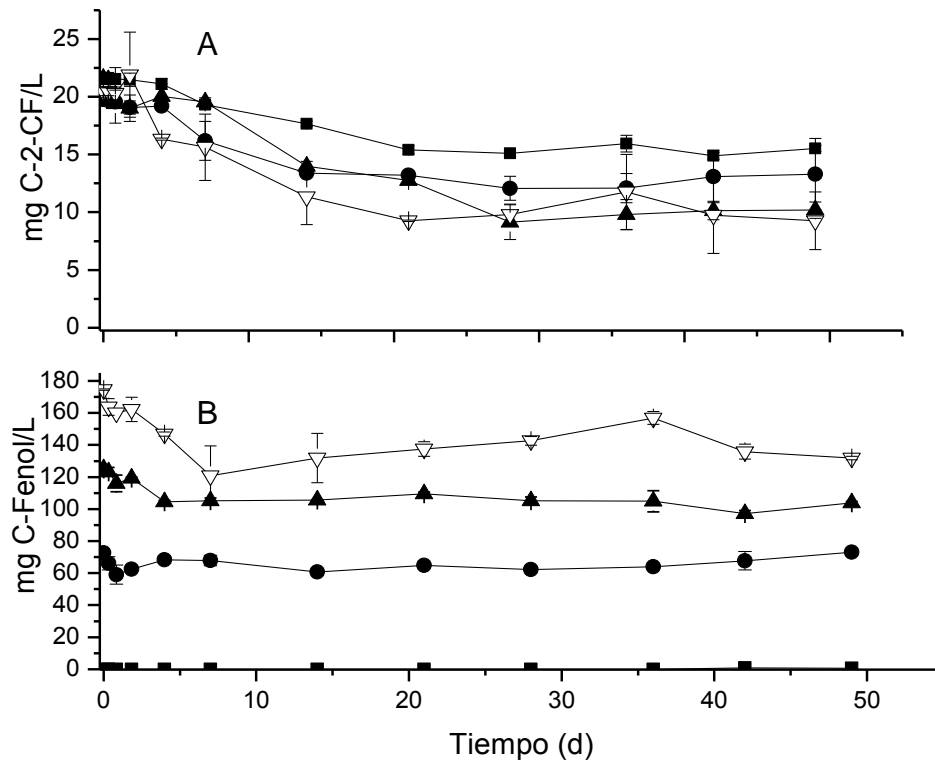
<sup>a</sup> mg C-2-CF / g SSV d

<sup>b</sup> mg C-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ mg de C-sustrato consumido

N.D.= No determinado

### 5.2.3.1 Consumo del 2-CF en presencia de fenol.

El consumo del 2-CF se incrementó con la adición de fenol, sin embargo, la eliminación del 2-CF no fue completa y hubo acumulación de fenol (Figura 5.2.1). A la concentración más alta de fenol la  $E_{2-CF}$  se incrementó hasta 1.87 veces más que el control, (Tabla 5.2.1). Los cambios de concentración después de 28 d de cultivo no fueron significativos. El balance de masa (Tabla 5.2.2) mostró que más del 88% del fenol que se alimentó se mantuvo casi constante. Este comportamiento podría entenderse por posibles efectos inhibitorios y / o tóxicos combinados del 2-CF y el fenol. Se han descrito, diversos efectos del fenol en la célula. Heipieper y col. 1992 observaron que concentraciones altas de fenol podrían modificar el contenido de ácidos grasos *trans* en la membrana celular de *Pseudomonas putida*, lo que podría provocar cambios en los mecanismos de transporte. También se sugiere que el fenol podría modificar la estructura y actividad de los gránulos microbianos (Jiang y col. 2004). Asimismo, los clorofenoles podrían estar relacionados con perturbaciones de la membrana celular (Czaplicka y col. 2004), como una disminución del índice de ácidos grasos insaturados (Dercová y col., 2004). La  $q_{2-CF}$  también aumentó y fue 2.5 veces mayor que el control (Tabla 5.2.1). En otros estudios se ha observado, que la adición de fenol mejoró el consumo de 2-CF, por ejemplo, Beristain-Montiel y col. (2010), observaron que la velocidad específica de consumo del 2-CF se incrementó en presencia de fenol (de 0.003 a 0.0044 mg C / g SSV d) y la eficiencia de eliminación también aumentó. Algunos trabajos señalan que al utilizar donadores de electrones con una estructura análoga al compuesto que se desea eliminar, se podría favorecer la eliminación del compuesto porque no sería necesario “rediseñar” su sistema enzimático (Wang y Loh, 1999; Lee y Lee 2007). En el presente trabajo el consumo de 2-CF en presencia de fenol fue un proceso principalmente desasimilativo debido a que el  $Y_{HC03-}$  fue mayor de 0.69. Además, el lodo desnitrificante mostró mejor comportamiento en el consumo de 2-CF cuando se adicionó fenol, ya que tanto la eficiencia como la velocidad específica de cultivo tuvieron incrementos notables.



**Figura 5.2.1** Eliminación de 2-CF (A) y formación de fenol (B) en presencia de diferentes concentraciones de fenol: (■) 0 control, (●) 77.6, (▲) 127.6, (▽) 177.6.

**Tabla 5.2.2.** Balance de Carbono a diferentes concentraciones de fenol en presencia de 2-CF

Entrada (mg/L)		Salida (mg/L)			
C-Fenol	C-2-CF	C-2-CF	C-Fenol	C-HCO <sub>3</sub> <sup>-a</sup>	C-CH <sub>4</sub>
72.71 ± 0.6	19.7 ± 0.13	16.8 ± 3.1	73.15 ± 1.7	4.02 ± 1.1	0
125.06 ± 0.09	21.59 ± 0.17	11.42 ± 0.59	115.55 ± 1.9	14.8 ± 0.56	0
174.6 ± 0.5	20.4 ± 0.3	10.87 ± 0.7	154 ± 10.43	18.42 ± 3.9	0

<sup>a</sup> El C- HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> es la suma del carbono inorgánico soluble + CO<sub>2</sub>.

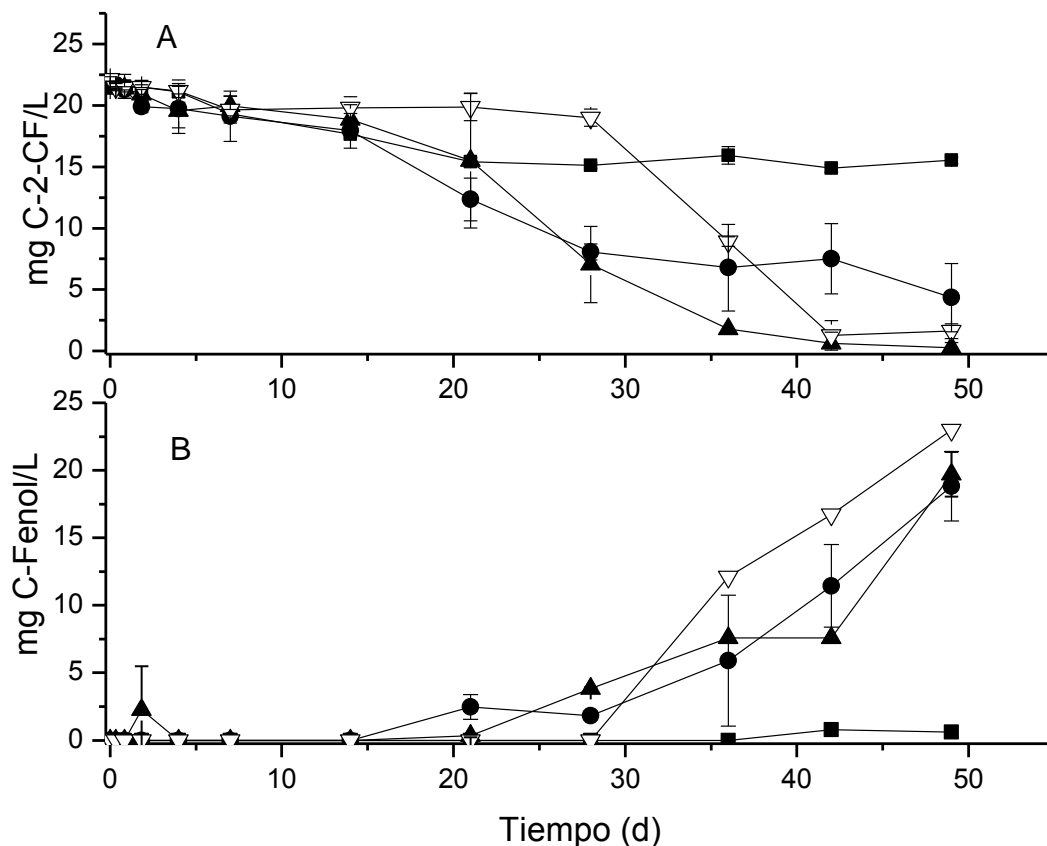
### 5.2.3.2 Consumo del 2-CF en presencia de acetato.

En comparación con el control, la adición de acetato disminuyó el tiempo de consumo del 2-CF, el cual se consumió casi en su totalidad en 49 d de cultivo (Figura 5.2.2 A), mientras que las  $E_{2-CF}$  se incrementaron hasta tener un valor de 98.6 % (Tabla 5.2.1). La  $q_{2-CF}$ , se incrementó conforme aumentó la concentración de acetato y fue hasta 8.4 veces más alta con respecto al control sin donador de electrones (Tabla 5.2.1). Sin embargo estos resultados difieren con los observados por Beristain-Montiel y col. (2010), donde la adición de acetato no mejoró la  $q_{2-CF}$ . Sin embargo, en las dos concentraciones más altas de acetato (127.6 mg C/L y 177.6 mg C/L) utilizadas, no se observó una diferencia significativa ( $\alpha=0.05$ ) en los valores obtenidos de  $q_{2-CF}$ . Esta conducta podría deberse a que las concentraciones de acetato podrían estar por arriba del valor de la constante  $K_s$  de saturación. Aguilar y col. (1995) reportaron un valor de  $K_s$  para el acetato de 186 mg/L (74.4 mg C/L) para un cultivo metanogénico mixto.

**Tabla 5.2.3.** Balance de carbono a diferentes concentraciones de acetato en presencia de 2-CF

Entrada (mg /L)		Salida (mg /L)				
C-acetato	C-2-CF	C-2-CF	C-acetato	C-HCO <sub>3</sub> <sup>-a</sup>	C-CH <sub>4</sub>	C-fenol
78.3 ± 1.02	21.67 ± 0.3	4.35 ± 2.77	0	75.3 ± 4.02	3.3 ± 1.1	18.81 ± 2.5
125.04 ± 2.4	21.39 ± 0.12	0.28 ± 0.40	0	94.6 ± 3.2	38.5 ± 4.05	19.70 ± 1.65
177.6 ± 0.5	21.4 ± 0.7	3.08 ± 1.2	0	123.4 ± 3.1	45.37 ± 2.2	22.9 ± 0.9

<sup>a</sup> El C- HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> es la suma del carbono inorgánico soluble + CO<sub>2</sub>.



**Figura 5.2.2** Eliminación de 2-CF (A) y formación de fenol (B) en presencia de diferentes concentraciones de acetato: (■) 0 control, (●) 77.6, (▲) 127.6, (▽) 177.6.

Por su parte, el acetato fue consumido en los primeros 4 días de cultivo excepto en la concentración más alta de éste (177.6 mg C/L), en donde se consumió totalmente hasta los 49 d de cultivo (datos no mostrados). En todos los casos, se observó la formación de fenol a partir del día 21 (Figura 5.2.2 B), aunque en la cinética de 128 mg C-acetato/L se detectó la formación transitoria de fenol en una etapa más temprana (2d). El fenol se acumuló en el medio de cultivo, aportando evidencia que la transformación del 2-CF fue por vía reductiva. En el control con solo 2-CF, se aprecia la formación de fenol hasta el día 42 de cultivo. Estos resultados, indican que la adición de un donador de

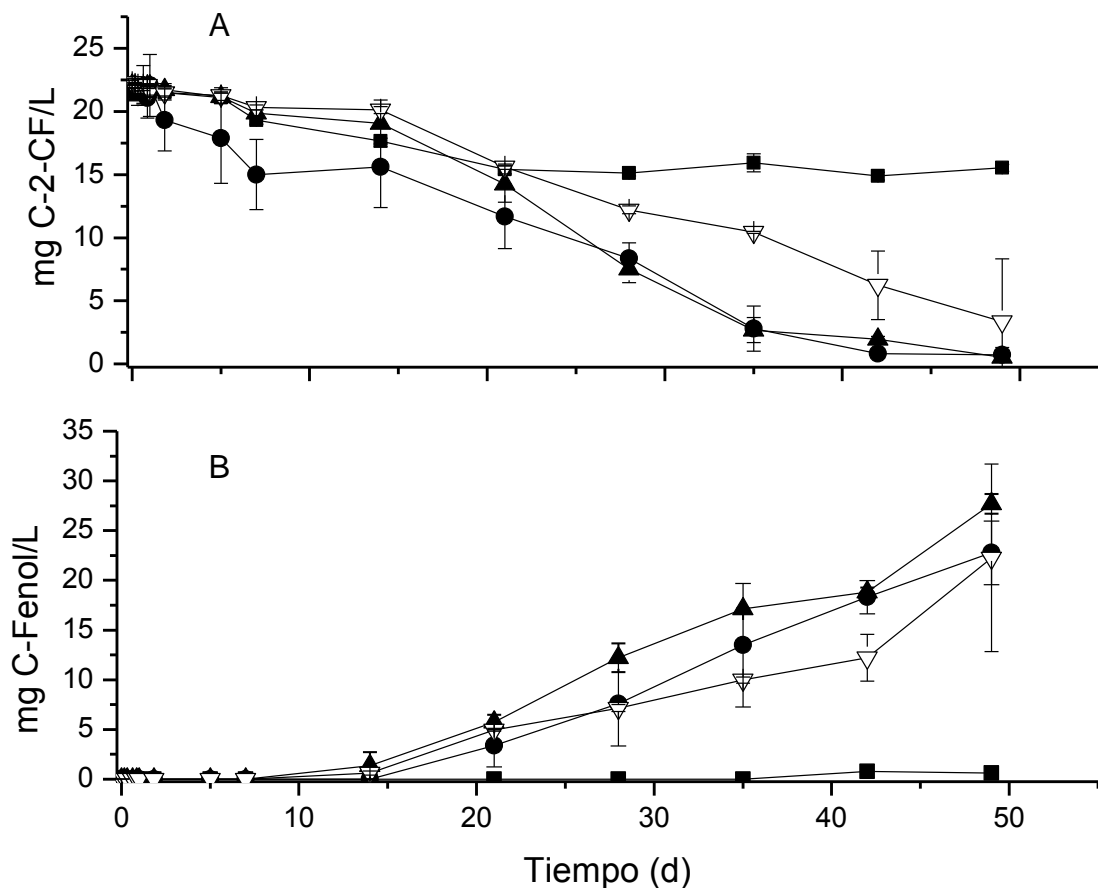
electrones impulsa la descloración reductiva. Lo cual coincide con trabajos previos en los que indican que la descloración reductiva requiere de la adición de compuestos reducidos externos que son utilizados como donadores de electrones para la reducción del 2-CF (Chang y col., 1996; Vallecillo y col., 1999). El balance de masa mostró que el acetato (Tabla 5.2.3) y el 2-CF fueron eficientemente consumidos ( $E_{\text{acetato}} = 100\%$  y  $E_{2\text{-CF}} = 92.4 \pm 9.4$ ) y principalmente mineralizados a bicarbonato con rendimientos  $Y_{\text{HCO}_3^-}$  que van desde 0.62 hasta 0.81 (Tabla 5.2.1). Los resultados muestran que al incrementar la concentración de acetato, los rendimientos de formación de metano aumentaron a  $0.03 \pm 0.01$ ,  $0.3 \pm 0.05$  y  $0.22 \pm 0.04$  para 77.6, 127.6 y 177.6 mg C-acetato/L respectivamente, lo cual sugiere una mayor actividad metanogénica.

#### ***5.2.3.3 Consumo del 2-CF en presencia de glucosa.***

La adicción de glucosa como donador de electrones disminuyó el tiempo de consumo del 2-CF a 49 d de cultivo (Figura 5.2.3 A). Las  $E_{2\text{-CF}}$  se incrementaron con la adición de glucosa, incluso obteniendo valores cercanos al 100% con respecto al control (Tabla 5.2.1). La  $q_{2\text{-CF}}$  también se incrementó con la adición de glucosa, fue hasta 3 veces más grande comparado con el control sin donador externo de electrones. Lo anterior, coincide con Atuanya y Chakrabarti (2003) quienes observaron que en condiciones anaerobias, la adición de glucosa incrementó el consumo de los clorofenoles, ya que en ausencia de glucosa el consumo fue mínimo o nulo. Por su parte, Puyol y col. (2009), observaron eficiencias altas (84%) en la eliminación del 2, 4-diclorofenol en un cultivo continuo usando glucosa como principal fuente de carbono. No obstante, Loh y Wang (1998), observaron que la adición de glucosa provocó una disminución en la velocidad de eliminación del 4-clorofenol, pero las condiciones fueron aerobias. Aunque la adición de glucosa aumentó el consumo de 2-CF, no se observaron diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) en los valores de  $q_{2\text{-CF}}$  en presencia de las diferentes concentraciones de glucosa (Tabla 5.2.1). Parece indicar que en el intervalo probado, la  $q_{2\text{-CF}}$  es independiente de la



concentración de glucosa. Este comportamiento se podría atribuir a que el intervalo de concentraciones de glucosa probadas podría estar por arriba del valor de la constante  $K_s$  de saturación. En este sentido, Costello y col. (1991) reportaron un valor de  $K_s$  de 23 mg de glucosa /L (9.2 mg C-glucosa/L).



**Figura 5.2.3.** Eliminación de 2-CF (A) y formación de fenol (B) en presencia de diferentes concentraciones de glucosa: (■) 0 control, (●) 77.6, (▲) 127.6, (▽) 177.6.

El consumo de glucosa se llevó a cabo casi en su totalidad a los 5 d de cultivo, periodo durante el cual se detectó la formación y acumulación transitoria de acetato. La formación de acetato inició a partir del día 1 ( $2.1 \pm 1.8$  mg C-acetato/L), se acumuló en el medio hasta obtener valores máximos de  $54.1 \pm 2.7$ ,  $70.5 \pm 4.5$  y  $105.5 \pm 1.3$  mg C-acetato

/L que corresponden a los ensayos de 77.6, 127.6 y 177.6 mg C-glucosa /L, respectivamente, estos valores se obtuvieron alrededor de los 28 d de cultivo, después de este periodo, la concentración de acetato disminuyó paulatinamente. Los resultados indican que al incrementar la concentración de glucosa se incrementó la concentración de acetato formado, bajo las condiciones experimentales probadas. Esto indica que la formación de acetato fue producto principalmente de la fermentación de la glucosa. A partir del día 14 se observó la formación de fenol como producto de la reducción del 2-CF (Figura 5.2.3 B). El balance de masa mostró que la glucosa (Tabla 5.2.4) y el 2-CF fueron eficientemente consumidos ( $E_{\text{glucosa}} = 100\%$  y  $E_{2\text{-CF}} = 93.1 \pm 7$ ) y mineralizados a bicarbonato con rendimientos de  $Y_{\text{HCO}_3}$  que van desde 0.42 hasta 0.59 (Tabla 1). También se observó la formación de metano con rendimientos de  $0.18 \pm 0.02$ ,  $0.28 \pm 0.01$  y  $0.084 \pm 0.001$  para 77.6, 127.6 y 177.6 mg C--glucosa /L. La información obtenida sugiere que estuvieron presentes varios procesos respiratorios, la fermentación, la metanogénesis y la descloración reductiva.

**Tabla 5.2.4** Balance de Carbono a diferentes concentraciones de glucosa en presencia de 2-CF

Entrada (mg/L)		Salida (mg/L)					
C-glucosa	C-2-CF	C-2-CF	C-glucosa	C-fenol	C-acetato	C-HCO <sub>3</sub> <sup>-a</sup>	C-CH <sub>4</sub>
75.53± 0.6	21.8 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0	19.25 ± 3.2	0	44.8 ± 1.1	22.14± 10.2
118.5 ± 0.8	22.06 ± 0.01	0.53 ± 0.7	0	27.7 ± 0.98	4.65± 0.7	83.2 ± 5.2	33.5± 1.07
166.85± 3.1	22.28 ± 0.2	3.35 ± 1.9	0	15.6± 1.42	95.7± 5.6	77.41 ± 1.9	14.2± 0.01

<sup>a</sup> El C- HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> es la suma del carbono inorgánico soluble + CO<sub>2</sub>.

El efecto favorable de la adición de glucosa o acetato (sustratos de fácil oxidación) sobre las  $E_{2\text{-CF}}$  y las  $q_{2\text{-CF}}$  se ha atribuido a que este tipo de compuestos podrían

suministrar poder reductor, disminuir el efecto inhibitorio de los clorofenoles, incrementar el crecimiento de la población microbiana o funcionar como un potenciador bioquímico (Lee y Lee, 2007; Martínez-Hernández y col., 2009).

Los resultados del presente trabajo indican que la adición de un donador de electrones incrementó tanto la  $E_{2\text{-CF}}$  como la  $q_{2\text{-CF}}$ . Bajo las condiciones experimentales probadas, parece ser que el tipo de donador de electrones tiene un mayor impacto sobre estos parámetros que su concentración. Asimismo, se observó que con los sustratos de fácil oxidación, se obtuvieron eficiencias de consumo similares a las obtenidas en trabajos en los que previamente se aclimató el inóculo (Majumder y Gupta, 2008; Beristain-Montiel y col., 2010). Esto indica que no fue necesaria la aclimatación previa del inóculo.

El tipo de donador de electrones así como su concentración, también podría contribuir a dirigir la vía metabólica que se desarrolla, ya que como lo indican los resultados, la producción de metano no es igual en todos los casos. En presencia de glucosa hubo una formación mayor de metano, seguida por acetato, mientras que en presencia de fenol no se detectó la formación de éste. Estos resultados sugieren, que la estructura química del donador de electrones determina los valores de eficiencia, rendimiento y velocidades específicas y no dependen de su similitud con el 2-CF.

#### 5.2.4 Conclusiones

La adición de un donador de electrones mejoró el consumo del 2-CF comparado con el control sin donador de electrones. Sin embargo, el comportamiento metabólico y cinético del lodo en presencia de acetato, fenol o glucosa, en el mismo intervalo de concentraciones fue diferente. Los resultados sugieren que el tipo de donador de electrones, más que su concentración, determina los valores de la eficiencia, rendimiento y velocidades específicas y no dependen de su similitud con el 2-CF. La  $q_{2\text{-CF}}$  y la  $E_{2\text{-CF}}$

obtenidas con la adición de acetato fueron hasta 8.4 y 3.4 veces más altas, respectivamente, en comparación con control. Entonces, la adición de un sustrato de fácil oxidación podría ser una alternativa apropiada para la eliminación de compuestos recalcitrantes como los clorofenoles sin que sea necesario un proceso previo de adaptación al compuesto.

### 5.2.5 Bibliografía

- APHA (1998). Standard methods for examination of water and wastewater (20th edn), American Public Health Association, Washington, D.C.
- Aguilar, A., Casas, C., Lafuente, J., Lema, J.M. (1995). Degradation of volatile fatty acids by differently enriched methanogenic cultures: kinetics and inhibition. *Water Res.* **29**, 505-509.
- Armenante, P.M., Kafkewitz, D., Jou, C.-J., Lewandowski, G. (1993). Effect of pH on the anaerobic dechlorination of chlorophenols in a defined medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 772-77.
- Atuanya, E.I., Chakrabarti, T. (2003). Biotreatability and kinetics of UASB reactor to mixtures of chlorophenol pollutants. *Environ. Monit. Assess.* **83**, 283-294.
- ATSDR, 2007. Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act (CERCLA) Priority List of Hazardous Substances.
- Beristain-Montiel, L., Gómez-Hernández, J., Monroy-Hermosillo, O., Cuervo-López, F., Ramírez-Vives, F. (2010). Methanization and mineralization of 2-chlorophenol by anaerobic digestion *Wat. Sci. Technol.* **62**, 1791-1797.

- Beristain-Montiel, L., Gómez, J., Monroy, O., Cuervo-López, F., Ramírez-Vives, F. (2012). Biodegradation of 2-chlorophenol (2CP) in an anaerobic sequencing batch reactor (ASBR). *Water Sci. Technol.* **65** (10), 1721-1728
- Boyd, S. and Shelton, D. (1984). Anaerobic biodegradation of chlorophenols in fresh and acclimated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 272-277
- Buitrón, G., Moreno-Andrade, I. (2011). Biodegradation kinetics of a mixture of phenols in a sequencing batch moving bed biofilm reactor under starvation and shock loads. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **86**, 669-674.
- Chang., B.V., Zheng, J.X., Yujan, S.Y. (1996). Effects of alternative electron donors, acceptors and inhibitors on pentachlorophenol dechlorination in soil. *Chemosphere.* **33**, 313-320.
- Costello, D.J., Greenfield, P.F., Lee, P.L. (1991). Dynamic modeling of single-stage high-rate anaerobic reactor- model verification. *Wat. Res.* **25**, 859-871.
- Dercová, K., Certik, M., Mal' ova, A., Sejácová, Z. (2004). Effect of chlorophenols on the membrane lipids of bacterial cells. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **54**, 251-254.
- Dietrich, G., and Winter J. (1990). Anaerobic degradation of chlorophenol by an enrichment culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 253-258.
- Farrel, A., Quilty, B. (1999). Degradation of mono-chlorophenols by a mixed microbial community via a meta-cleavage pathway. *Biodegradation* **10**, 353-362.
- Garibay-Orijel, C., Hoyo-Vadillo, C., Ponce-Noyola, T., García-Mena, J., Poggi-Varaldo, H. (2006). Impact of long-term partial aeration the removal of 2,4,6-trichlorophenol in an initial methanogenic fluidized bed bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **94**, 949-960

- Häggbloom, M. M., Bossert, I. D. (2003). Halogenated organic compounds – a global perspective. In Dehalogenation microbial processes and environmental applications. pp. 3. Edited by Kluwer Academic Publishers, USA.
- Jiang, H.-L., Tay, J.-H., Tay, S. T.-L. (2004). Changes in structure, activity and metabolism of aerobic granules as a microbial response to high phenol loading. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**, 602-608.
- Lanthier, M., Juteau, P., Lépine, F., Beaudet, R., Villemur, R. (2005) *Desulfitobacterium hafniense* is present in a high proportion within the biofilms of a High-performance pentachlorophenol-degrading, methanogenic fixed-film reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1058-1065.
- Lee, C.-Y., Lee Y.-P. (2007). Degradation of 4-chlorophenol by enriched mixed cultures utilizing phenol and glucose as added growth substrate. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 383-391.
- Loh, K.-C., Wang, S.-J. (1998). Enhancement of biodegradation of phenol and nongrowth substrate 4-chlorophenol by medium augmentation with conventional carbon sources. *Biodegradation* **8**, 329-338.
- Loh, K.-C., Wu, T. (2006). Cometabolic transformation of 2-chlorophenol and 4-chlorophenol in the presence of phenol by *Pseudomonas putida*. *Can. J. Chem. Eng.* **84**, 356-367.
- Majumder, P.S., Gupta, S.K. (2007). Removal chlorophenols in sequential anaerobic-aerobic reactors. *Bioresour. Technol.* **98**, 118-129.
- Majumder, P.S., Gupta, S.K. (2008). Degradation of 4-chlorophenol in UASB reactor under methanogenic conditions. *Bioresour. Technol.* **99**, 4169-4177.
- Martínez-Hernández, S., Olguín E. Gómez, J., Cuervo-López, F., (2009). Acetate enhances specific consumption rate of toluene under denitrifying conditions. *Arch. Environ Contam. Toxicol.* **57**, 679-687.

- Milliken, C.E., Meier, G.P., Sowers, K.R., May, H.D. (2004). Chlorophenol production by anaerobic microorganisms: transformation of a biogenic chlorinated hydroquinone metabolite. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 2494-2496.
- Mohn, H., Puhakka, J.A., Ferguson, J.F. (1999). Effects of electron donors on degradation of pentachlorophenol in a methanogenic fluidized bed reactor. *Environ. Technol.* **20**, 909-920.
- Puyol, D., Mohedano, A.F., Sanz, J.L., Rodríguez, J.J. (2009). Comparison of UASB and EGSB performance on the anaerobic biodegradation of 2,4-dichlorophenol. *Chemosphere* **76**, 1192-1198.
- Takeuchi, R., Suwa, Y., Yamagishi, T., Yonezawa, Y. (2000). Anaerobic transformation of chlorophenols in methanogenic sludge unexposed to chlorophenols. *Chemosphere* **41**, 1457-1462.
- Vallecillo, A., García-Encina, P.A., Peña, M. (1999). Anaerobic Biodegradability and toxicity of chlorophenols. *Water Sci. Technol.* **40**, 161-168.
- Wang, S.-J., Loh, K.C. (1999). Facilitation of cometabolic degradation of 4-chlorophenol using glucose as added growth substrate. *Biodegradation.* **10**, 261-269.
- Ye, F.-x., Shen, D.-s. (2004). Acclimation of anaerobic sludge degrading chlorophenols and the biodegradation kinetics during acclimation period. *Chemosphere* **54**, 1573-1580.

## 5.3 Comportamiento respiratorio de un lodo desnitrificante en presencia y ausencia del 2-CF.

### 5.3.1 Resumen

Los clorofenoles son compuestos recalcitrantes, frecuentes en la naturaleza y tienen efectos nocivos a concentraciones bajas. Se ha observado que es posible eliminarlos a través de diversos procesos biológicos anaerobios. La información del efecto de los clorofenoles sobre el proceso desnitrificante es aún escasa. El objetivo de este estudio fue evaluar el proceso desnitrificante en presencia y ausencia del 2-clorofenol (2-CF), utilizando diferentes donadores de electrones (fenol, acetato o glucosa). El comportamiento del cultivo desnitrificante con fenol en presencia de 2-CF mostró una disminución de las  $E_{NO_3^-}$  y  $E_{fenol}$  hasta un 23% y un 98% respectivamente, en comparación con el cultivo en ausencia del 2-CF. La  $q_{NO_3^-}$  y la  $q_{fenol}$  también disminuyeron hasta 6 y 32.3 veces, respectivamente. En los ensayos con acetato en presencia de 2-CF, los valores obtenidos de las  $E_{acetato}$  y  $E_{NO_3^-}$  fueron muy semejantes a los obtenidos en ausencia de 2-CF. La  $q_{NO_3^-}$  y  $q_{acetato}$  en cambio aumentó 1.36 y 2 veces, respectivamente, a la concentración de acetato de 177.6 mg C-acetato/L. En los ensayos con glucosa en presencia del 2-CF, la  $E_{NO_3^-}$  disminuyó y la  $E_{glucosa}$  fue muy similar al cultivo en ausencia del 2-CF. Por su parte, la  $q_{NO_3^-}$  fue hasta 1.87 veces menor que la obtenida con el cultivo sin 2-CF. El efecto del 2-CF sobre el cultivo fue diferente dependiendo del donador de electrones que se utilizó. La desnitrificación con acetato fue el proceso menos afectado con la presencia del 2-CF. Estos resultados muestran que el diseño de la alimentación juega un papel importante en el desempeño del proceso desnitrificante.

Palabras clave: **desnitrificación, 2-clorofenol, fenol, acetato, glucosa**



### 5.3.2 Introducción

Los clorofenoles son compuestos recalcitrantes que tienen umbrales organolépticos muy bajos. En el caso particular del 2-clorofenol el umbral de sabor y olor es de 0.1  $\mu\text{g/L}$  y 10  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente (OMS, 2003). Los clorofenoles son compuestos tóxicos y probablemente cancerígenos. La Agencia Internacional para Investigación sobre el Cáncer (IARC) ha enlistado estos compuestos como carcinógenos 2B (IARC, 1986).

Tanto los clorofenoles como el nitrato son contaminantes, que pueden encontrarse en distintos ambientes acuáticos. La contaminación de aguas superficiales y subterráneas por nitrato se debe principalmente al uso excesivo de fertilizantes en la agricultura. Se ha señalado que la contaminación del agua subterránea por nitrato es un problema que amenaza el abastecimiento de agua potable (Muñoz y col., 2004). Una concentración alta de nitrato en el agua potable puede afectar la salud dado que puede provocar metahemoglobinemia en infantes y posiblemente cáncer (Forman, 1991). Diversos estudios se han realizado para estudiar la eliminación de los clorofenoles en condiciones desnitrificantes (Hägglom y col. 1993; Bae y col. 2002; Chang y col., 2004; Wang y col., 2012). Hay trabajos que indican que es posible acoplar la reducción del nitrato a la eliminación de los clorofenoles (Jianlong y col., 2001; Bae col. 2002), otros estudios señalan que el nitrato compete con el clorofenol como aceptor de electrones (Chang y col., 2003). Sin embargo, no se dispone de información, acerca del efecto que puede tener la presencia de los clorofenoles en los consorcios microbianos y su efecto sobre el proceso biológico desnitrificante. En otros procesos biológicos, como en la nitrificación se han realizado algunos estudios que indican que los clorofenoles inhiben la actividad nitrificante, por ejemplo, disminuyen la velocidad específica de consumo de amonio (Sato y col., 2005; Martínez-Hernández y col., 2010). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar a través de variables de respuesta como velocidades de consumo, eficiencias y rendimientos el proceso desnitrificante en presencia y ausencia

del 2-CF, utilizando diferentes fuentes reductoras como el fenol, acetato o glucosa a diferentes concentraciones.

### 5.3.3 Materiales y métodos

#### 5.3.3.1 Inóculo

El inóculo utilizado en los cultivos en lote fue obtenido de un reactor anaerobio de cama de lodos de flujo ascendente (UASB, upflow anaerobic sludge blanket) de 1.4 L de volumen de trabajo alimentado con acetato como fuente de carbono (0.8 g C-acetato/L). La composición del medio mineral fue la siguiente (g/L):  $K_2HPO_4$  (3),  $MgSO_4$  (0.03),  $NaNO_3$  (2.42). Los elementos traza fueron adicionados para tener la siguiente concentración final (mg/L):  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (7.5),  $Na_2MoO_4 \cdot H_2O$  (1),  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  (70),  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (7),  $MnCl_2$  (5). El sistema fue operado durante 5 meses en estado estacionario a 30 °C y con un tiempo de residencia hidráulico de 2 d. En estas condiciones experimentales, las eficiencias de consumo de carbono y de nitrógeno fueron de 95.87 %  $\pm$  3 y 98.91 %  $\pm$  3.5 respectivamente. El  $Y_{HCO_3^-}$  fue de  $0.95 \pm 0.04$  g C- $HCO_3^-$  / (g C-orgánico consumido) y el  $Y_{N_2}$  fue de  $0.79 \pm 0.042$  g  $N_2$  / (g N- $NO_3^-$ ). De esta manera se puede decir que el lodo estaba fisiológicamente estabilizado. El inóculo obtenido del reactor UASB fue previamente centrifugado a 4000 g por 10 min y lavado tres veces con una solución de NaCl (9 g/L) antes de ser utilizado en los cultivos en lote.

#### 5.3.3.2 Cultivos en lote

Los ensayos fueron conducidos en botellas serológicas de 545 mL con un volumen de trabajo de 400 mL. El medio mineral usado en todos los ensayos fue el siguiente (g/L):  $K_2HPO_4$  (0.72),  $KH_2PO_4$  (0.27),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.03),  $NaHCO_3$  (0.026). Los elementos traza fueron adicionados para tener la siguiente concentración final (mg/L):  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (7.5),

$\text{Na}_2\text{Mo}_4\text{H}_2\text{O}$  (1),  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (70),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (7),  $\text{MnCl}_2$  (5). Las botellas fueron selladas con tapas de goma y con contratapas de aluminio y el espacio de cabeza fue reemplazado con una corriente de He durante 10 min.

#### ***5.3.3.3 Ensayos desnitrificantes en presencia o ausencia de 2-clorofenol utilizando diferentes donadores de electrones.***

Ensayos cinéticos, con medio mineral, lodo desnitrificante, acetato, glucosa o fenol a diferentes concentraciones (77, 127 y 177 mg C/L) y nitrato a diferentes concentraciones (25, 37.5 y 50 mg N/L) se llevaron a cabo. Bajo estas mismas condiciones (tipo de donador de electrones y concentraciones de éstos), también se realizaron ensayos cinéticos en presencia de 2-clorofenol (22.4 mg C/L).

#### ***5.3.3.4 Ensayos de recuperación***

Se llevaron a cabo ensayos de recuperación, en donde los lodos desnitrificantes previamente expuestos a C-2-CF (22 mg/L) durante 72 días, fueron lavados dos veces con una solución isotónica de NaCl e incubados en medio mineral con  $\text{N-NO}_3^-$  (83 mg /L) mas C-acetato (100 mg /L). Estos cultivos fueron comparados con otros cultivos (inoculados con lodo proveniente del reactor en continuo) sin previa exposición al C-2-CF, usando el mismo medio de cultivo (nitrato/acetato).

Todos los ensayos fueron llevados a cabo por duplicado. Cada botella representó una cinética y los valores obtenidos en todos los ensayos están representados como el valor promedio  $\pm$  la desviación estándar. Muestras líquidas y del espacio de cabeza fueron tomadas periódicamente para ser analizadas y determinar la concentración de sustratos y formación de productos. Las muestras fueron filtradas antes de ser analizadas utilizando una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ .

### **5.3.3.5 Métodos analíticos**

La concentración de 2-clorofenol y fenol fue determinada usando cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, Perkin Elmer series 200, USA), equipado con una columna C-18 (Phenomenex, USA). La fase móvil fue acetonitrilo-agua (60:40 v/v) a 1.5 mL /min. La composición del gas en el espacio de cabeza (CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>) fue cuantificada por cromatografía de gases (Varian 3350, USA) equipado con un detector de conductividad térmica y una columna de acero empacada (Poropak Q Mesh 80-100). Las temperaturas de la columna, inyector y detector fueron de 50, 100 y 100° C, respectivamente, el flujo del gas acarreador (He) fue de 16 mL/min. La concentración de la glucosa fue determinada mediante el analizador bioquímico YSI 2700 (YSI Inc), utilizando la membrana YSI 2365. La concentración de acetato fue cuantificada por cromatografía de gases (Hewlett Packard 5890, USA) como previamente fue descrito por Martínez-Hernández y col. (2009). El carbón orgánico y carbono inorgánico fueron medidos usando un analizador de carbono total (TOC) (Shimadzu, TOC-VCSN, Japan). Los sólidos suspendidos volátiles (SSV, SST) fueron determinados de acuerdo al standard methods (APHA, 1998).

### **5.3.3.6 Variables de respuesta**

El proceso fue evaluado a través de eficiencias de consumo (E, mg sustrato consumido/mg de sustrato alimentado), rendimientos (Y, mg de producto/ mg de sustrato consumido) y velocidades específicas de consumo sustrato y formación de producto (q, mg sustrato consumido o producto formado/g SSV d). El cálculo de las velocidades específicas de consumo de sustrato o formación de producto se realizaron mediante un análisis de regresión lineal de las curvas obtenidas ( $r > 0.95$ ).

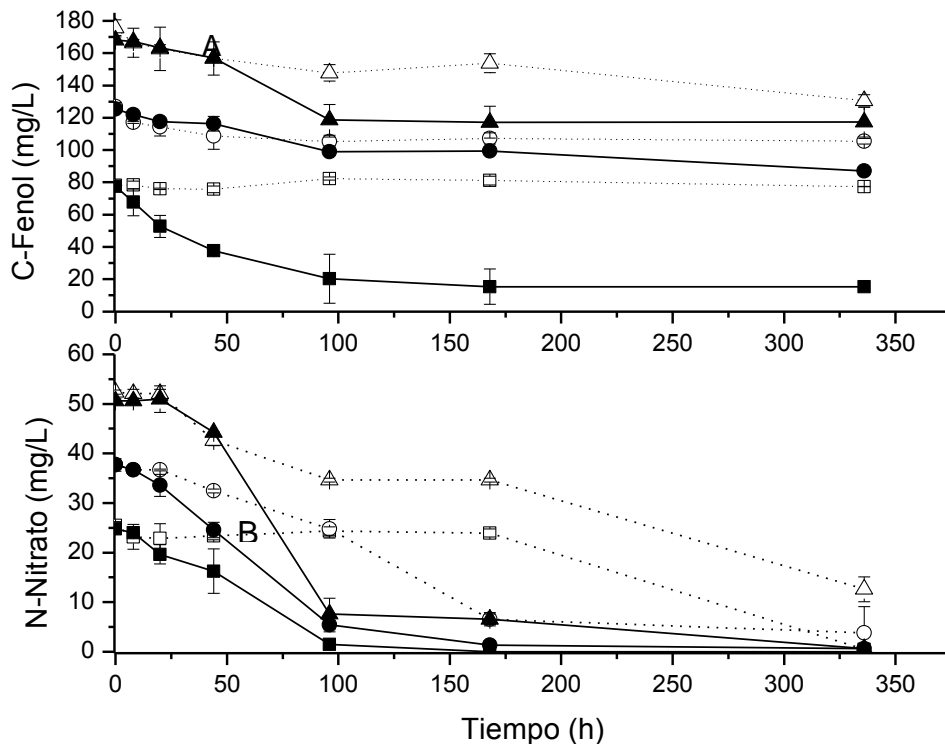
### 5.3.3 Resultados y discusión

#### 5.3.3.1 Ensayos desnitrificantes con fenol en presencia o ausencia de 2-clorofenol

Cuando se realizó la cinética desnitrificante utilizando el fenol como donador de electrones sin el 2-CF, se observó que la mayor parte del nitrato se consumió en las primeras 96 h independientemente de la concentración de fenol empleada, con un consumo simultáneo de fenol (Figura 5.3.1). Sin embargo, una vez que el nitrato se consumió totalmente el consumo de fenol disminuyó. Esto se podría deber a que la posible inhibición y/o toxicidad propia del fenol se acentúa al no contar con un aceptor de electrones con un potencial redox tan alto como el nitrato. Eiora y col. (2005) observaron una inhibición del proceso desnitrificante a partir de una concentración de fenol de 360 mg/L. Estos efectos inhibitorios se podrían deber a alteraciones en la membrana celular causados por la presencia del fenol en el medio. Por ejemplo, Heipieper y col. 1992 observaron que concentraciones altas de fenol podrían modificar el contenido de ácidos grasos *trans* en la membrana celular de *Pseudomonas putida*. Por otro lado, las  $E_{\text{fenol}}$  disminuyeron conforme se incrementó la concentración de fenol, el valor más bajo fue de 30.2 %, mientras que, la  $E_{\text{NO}_3^-}$  fue cercana al 100% en todos los casos (Tabla 5.3.1). Se observó también, una ligera disminución en los  $Y_{\text{HCO}_3^-}$  y  $Y_{\text{N}_2}$  al aumentar la concentración de fenol. La  $q_{\text{fenol}}$  más alta se obtuvo a la concentración más baja de fenol utilizada. El balance de materiales mostró que el proceso fue principalmente desasimilativo, obteniendo un  $Y_{\text{HCO}_3^-}$  igual o superior a 0.6.

El comportamiento del cultivo en presencia de 2-CF fue diferente, el consumo tanto de nitrato como de fenol disminuyó. En la Figura 5.3.1, se observa que la mayor parte del nitrato se consumió en las primeras 336 h, esto es, 240 h más que en la cinética sin 2-CF. La  $E_{\text{NO}_3^-}$  y  $E_{\text{fenol}}$  también disminuyeron hasta un 23% y un 97% respectivamente, en comparación con las cinéticas sin 2-CF. En lo que se refiere a la  $q_{\text{NO}_3^-}$  esta disminuyó de 2.4 hasta 6 veces, mientras que, la  $q_{\text{fenol}}$  disminuyó hasta 32.3 veces, en comparación con la cinética sin 2-CF (Tabla 5.3.2). Una posible explicación a este comportamiento es

el efecto tóxico y/o inhibitorio de los clorofenoles el cual ha sido previamente reportado (Gregus y Klaassen, 2001; Pepelko y col., 2005; Liu y col., 2008). Por otra parte, se ha mencionado que compuestos aromaticos como el fenol pueden activar mecanismos de defensa, incrementando la rigidez de la membrana, modificando la permeabilidad y haciendo que la difusión del compuesto aromatico sea más difícil (Radniecki y col., 2008). El balance de materiales mostró que el proceso fue desasimilativo con valores de  $Y_{HCO_3^-}$  mayores a 0.8 y con  $Y_{N_2}$  alrededor de 0.9 en todos los casos. El consumo del 2-CF fue bajo, con valores de  $E_{2-CF}$  que oscilaron entre 15.1 y 31.6 %. Estos resultados sugirieron que la presencia del 2-CF afectó el consumo tanto de fenol como de nitrato, siendo al parecer el consumo de fenol el más afectado.



**Figura 5.3.1.** Cinética desnitrificante en presencia de diferentes concentraciones de fenol, (A) Consumo de fenol y (B) consumo de nitrato: (■) 77, (●) 127, (▲) 177.6 mg C-fenol/L. Figura llena y línea continua en ausencia de 2-CF; figura vacía y línea punteada en presencia de 2-CF.

**Tabla 5.3.1** Parámetros cinéticos del proceso desnitrificante utilizando diferentes donadores de electrones en ausencia de 2-CF

Fuente de Carbono (mg/L)	$q_c^a$	$q_{NO_3^-}^b$	$E_c$	$E_{NO_3^-}$	$Y_{HCO_3^-}$	$Y_{N_2}$
Fenol (77.6) + $NO_3^-$ (25)	$40.14 \pm 11.67$	$12.36 \pm 1.25$	$80.9 \pm 13.1$	100	$0.9 \pm 0.2$	$0.9 \pm 0.004$
Fenol (127.6) + $NO_3^-$ (37.5)	$12.39 \pm 0.4$	$16.59 \pm 0.97$	$30.52 \pm 1.91$	$98.27 \pm 0.52$	$0.74 \pm 0.02$	$1.08 \pm 0.12$
Fenol (177.6) + $NO_3^-$ (50)	$25.9 \pm 4.1$	$24.62 \pm 1.01$	$30.2 \pm 6.3$	$98.83 \pm 0.52$	$0.60 \pm 0.03$	$0.87 \pm 0.01$
Acetato (77.6) + $NO_3^-$ (25)	$75.012 \pm 1.58$	$58.69 \pm 0.43$	$86.7 \pm 4.7 \%$	100	$0.94 \pm 0.01$	$0.87 \pm 0.02$
Acetato (127.6) + $NO_3^-$ (37.5)	$99.4 \pm 6.57$	$84.15 \pm 2.13$	$76.3 \pm 4.9\%$	$95.39 \pm 6.5$	$0.90 \pm 0.04$	$0.95 \pm 0.006$
Acetato (177.6) + $NO_3^-$ (50)	$180.35 \pm 0.88$	$88.12 \pm 3.051$	$91.6 \pm 0.3\%$	$96.47 \pm 4.56$	$0.95 \pm 0.01$	$0.98 \pm 0.2$
Glucosa (77.6) + $NO_3^-$ (25)	$379.56 \pm 2.8$	$43.06 \pm 0.9$	$86.97 \pm 7.2$	$98.9 \pm 0.9$	$0.82 \pm 0.02$	$0.65 \pm 0.1$
Glucosa (127.6) + $NO_3^-$ (37.5)	$492 \pm 39.8$	$66.9 \pm 5.2$	100%	$92.04 \pm 1.92$	$0.68 \pm 0.01$	$0.77 \pm 0.07$
Glucosa (177.6) + $NO_3^-$ (50)	$666.5 \pm 7.8$	$96.92 \pm 4.5$	100%	$92.8 \pm 0.95$	$0.64 \pm 0.04$	$0.72 \pm 0.02$

La eficiencia y rendimientos fueron calculados a 336 h, 44h y 24h para el fenol, acetato y glucosa, respectivamente

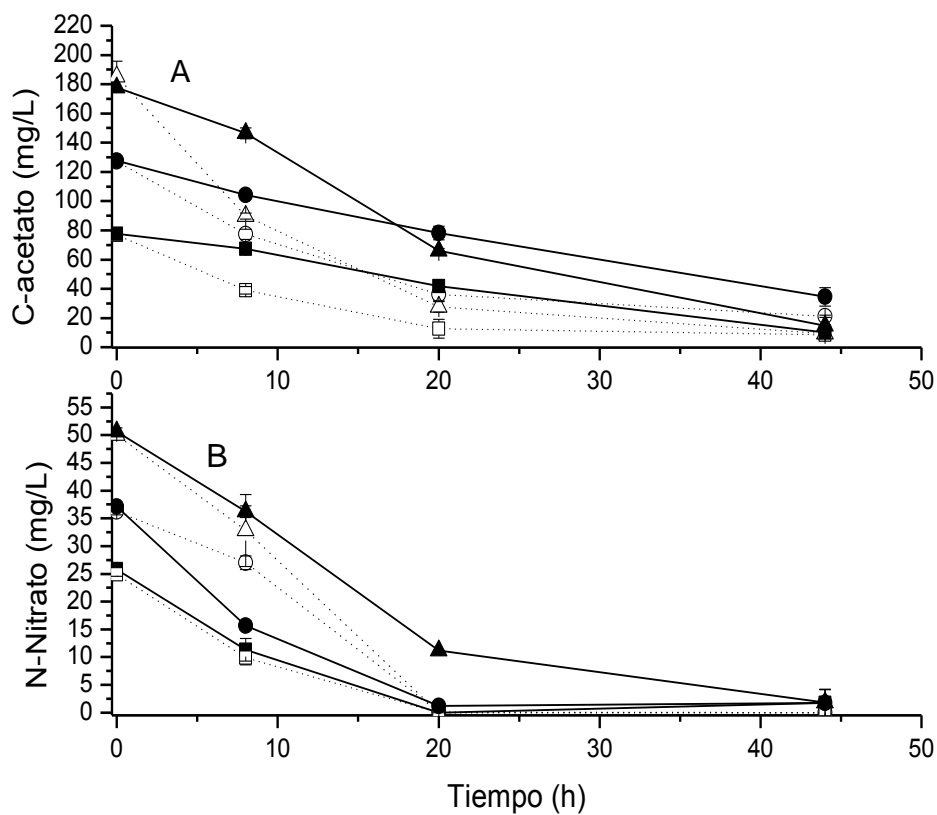
<sup>a</sup> mg C ó N/g SSV d

### 5.3.3.2 Ensayos desnitrificantes con acetato en presencia o ausencia de 2-clorofenol

En la Figura 5.3.2, se observa el perfil del consumo de acetato y nitrato en ausencia de 2-CF, tanto el acetato como el nitrato se consumen casi en su totalidad a las 44h de cultivo. Las  $E_{NO_3^-}$  fueron cercanas al 100% y la  $E_{acetato}$  en promedio fueron de  $84.8 \pm 7.8$  %. Tanto la  $q_{NO_3^-}$  y la  $q_{acetato}$  se incrementaron conforme se aumentó la concentración de acetato y nitrato. El balance de materiales indicó que el proceso fue desasimilativo con un  $Y_{HCO_3^-}$  mayor a 0.9 y un  $Y_{N_2}$  alrededor de 0.9.

El perfil de consumo de nitrato y acetato en presencia de 2-CF fue muy similar al observado en ausencia de 2-CF (Figura 5.3.2). Los valores obtenidos de las  $E_{acetato}$  y  $E_{NO_3^-}$  fueron muy semejantes a los obtenidos en ausencia de 2-CF, con un coeficiente de variación menor del 10% y 5%, respectivamente (Tabla 5.3.1). Mientras que, el consumo de 2-CF en el periodo de prueba fue casi nulo con  $E_{2-CF}$  menores del 4.1 %. Sin embargo, el comportamiento en términos de velocidad específica de consumo fue diferente, la  $q_{acetato}$  se incrementó alrededor de dos veces en presencia del 2-CF en comparación con la velocidad obtenida en ausencia de 2-CF, mientras que la  $q_{nitrato}$  se incrementó como máximo 1.36 veces en presencia de 2-CF (Tabla 5.3.2). Por otro lado la  $E_{2-CF}$  fue menor del 5% en todos los casos, sin que se detectará la formación de fenol. El  $Y_{HCO_3^-}$  disminuyó casi a la mitad del obtenido en el cultivo en ausencia del 2-CF. Los  $Y_{N_2}$  fueron altos en todos los casos con valores cercanos o por arriba de 0.9, lo que indicó que la desnitrificación fue la ruta principal. Este comportamiento observado en el consumo de acetato se puede deber a modificaciones en la membrana celular causada por la presencia del 2-CF, como previamente se ha reportado (Keweloh y Heipieper, 1996; Kolomytseva, y col., 2005), esto puede cambiar la fluidez de la membrana y permitir que el acetato mejore su transporte y por ende que la velocidad específica de consumo se incremente. Los resultados sugieren que cuando se utiliza acetato como donador de electrones el proceso desnitrificante no se ve afectado negativamente en presencia de 2-CF.





**Figura 5.3.2** Cinética desnitrificante en presencia de diferentes concentraciones de acetato. (A) Consumo de acetato y (B) consumo de nitrato: (■) 77, (●) 127, (▲) 177.6 mg C-acetato /L. Figura llena y línea continua en ausencia de 2-CF; figura vacía y línea punteada en presencia de 2-CF.

**Tabla 5.3.2.** Parámetros cinéticos del proceso desnitrificante utilizando diferentes donadores de electrones en presencia de 2-CF

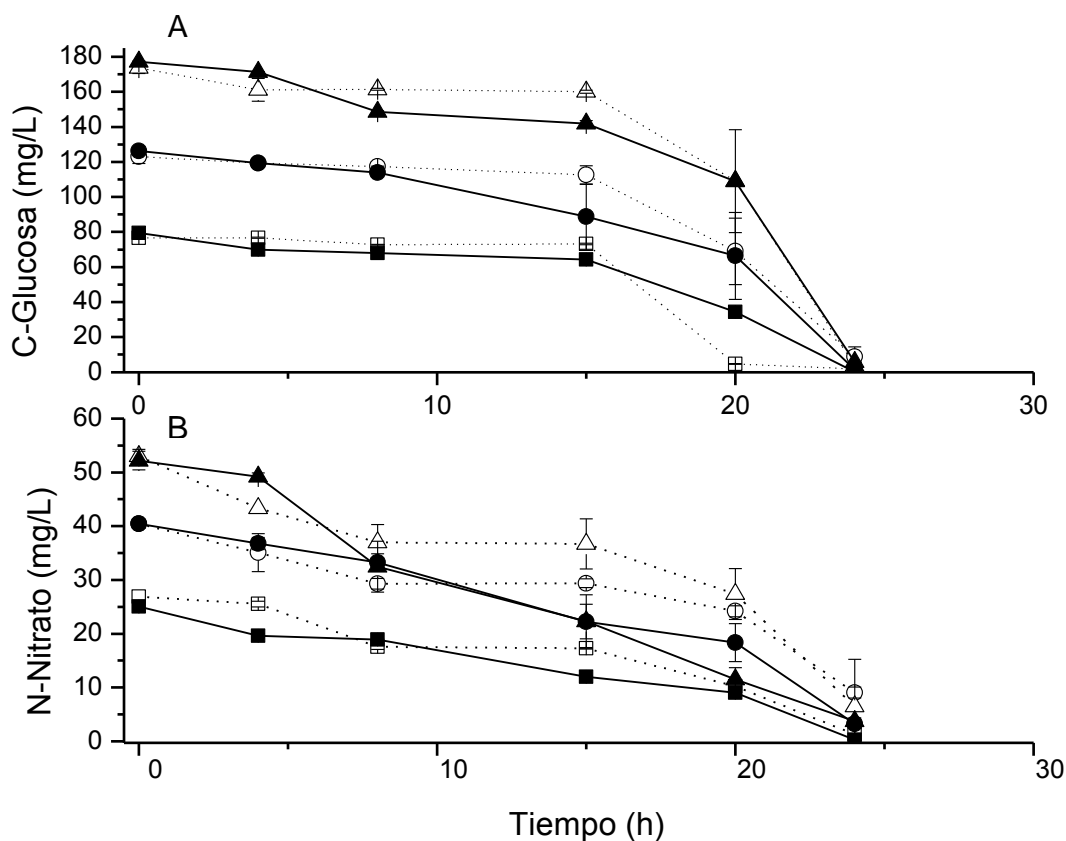
Fuente de Carbono (mg/L)	qc <sup>a</sup>	q <sub>NO3-</sub> <sup>a</sup>	E <sub>C</sub> (%)	E <sub>nitrato</sub> (%)	Y <sub>HCO3-</sub>	Y <sub>N2</sub>
Fenol (77.6) + 2-CF + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.24 ± 0.09	5.1 ± 0.33	1.11 ± 0.82	98.04 ± 2.8	0.88 ± 0.1	0.97 ± 0.02
Fenol (127.6) + 2-CF + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.75 ± 0.9	4.64 ± 1.8	16.87 ± 0.32	90.02 ± 14.1	0.80 ± 0.06	0.91 ± 0.12
Fenol (177.6) + 2-CF + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	4.64 ± 0.18	4.08 ± 0.27	15.76 ± 15.7	75.91 ± 14.1	0.82 ± 0.1	1.07 ± 0.08
Acetato (77.6) + 2-CF + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	150.62 ± 15.48	59.35 ± 15.4	88.8 ± 0.3	100	0.67 ± 0.01	1.0 ± 0.04
Acetato (127.6) + 2-CF + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	215.06 ± 10.8	91.35 ± 0.5	83.4 ± 0.2	99.76 ± 0.33	0.45 ± 0.01	0.97 ± 0.04
Acetato (177.6) + 2-CF + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	369.1 ± 31.7	120.4 ± 2.15	94.9 ± 0.3	100	0.46 ± 0.01	0.95 ± 0.04
Glucosa (77.6) + 2-CF + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	226.2 ± 3.13	34.64 ± 1.90	97.7 ± 0.9	99.6 ± 0.5	0.48 ± 0.06	0.77 ± 0.1
Glucosa (127.6) + 2-CF + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	527.53 ± 15.65	40.28 ± 0.09	92.92 ± 4.4	77.6 ± 2.9	0.7 ± 0.09	0.73 ± 0.01
Glucosa (177.6) + 2-CF + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	780.8 ± 28.02	51.8 ± 0.25	97.9 ± 1.09	87.52 ± 13.7	0.77 ± 0.12	0.83 ± 0.1

La eficiencia y rendimientos fueron calculados a 336 h, 44h y 24h para el fenol, acetato y glucosa, respectivamente

<sup>a</sup> mg C ó N/g SSV d

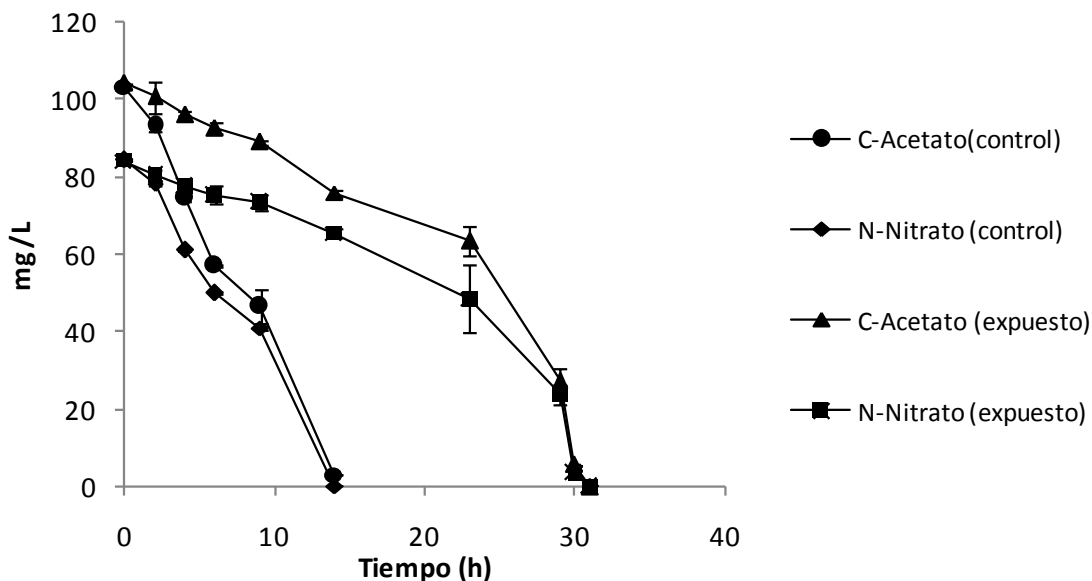
### 5.3.3.3 Ensayos desnitrificantes con glucosa en presencia o ausencia de 2-clorofenol

En la cinética desnitrificante con glucosa en ausencia de 2-CF, se observó que el nitrato se consumió en las primeras 24 h, con un consumo simultáneo de glucosa (Figura 5.3.3). Por otro lado, las  $E_{\text{glucosa}}$  y  $E_{\text{NO}_3^-}$  fueron en todos los casos cercanos al 100% (Tabla 5.3.1). La  $q_{\text{glucosa}}$  se incrementó conforme se aumentó la concentración de la glucosa hasta un valor de 666.5 mg C-Glucosa/gSSV d. La  $q_{\text{NO}_3^-}$ , por su parte, aumentó conforme se incrementó la concentración de nitrato. El balance de materiales mostró que el proceso fue principalmente desasimilativo con un intervalo de  $Y_{\text{HCO}_3^-}$  de 0.64 a 0.83.



**Figura 5.3.3** Cinética desnitrificante en presencia de diferentes concentraciones de glucosa. (A) consumo de glucosa y (B) consumo de nitrato: (■) 77, (●) 127, (▲) 177.6 mg C-glucosa /L. Figura llena y línea continua en ausencia de 2-CF; Figura vacía y línea punteada en presencia de 2-CF.

El comportamiento del cultivo en presencia de 2-CF fue muy similar a la cinética en ausencia de 2-CF. La glucosa se consumió durante las primeras 24 h y el consumo de nitrato se llevó a cabo casi en su totalidad a las 24 h, sin embargo, se observa una ligera disminución en el consumo de nitrato en presencia del 2-CF comparado con la cinética sin 2-CF (Figura 5.3.3). La  $E_{NO_3^-}$  disminuyó hasta un valor de 77.6%, y la  $E_{glucosa}$  fue en todos los casos cercana al 100%, mientras que, no se observó un consumo del 2-CF. El consumo de 2-CF fue nulo en todos los casos. Los  $Y_{N_2}$  fueron altos en todos los casos con valores cercanos o por arriba de 0.7, lo que indica que la desnitrificación fue la ruta principal. El balance de materiales mostró que el proceso fue desasimilativo con rendimientos de  $HCO_3^-$  hasta 0.77. La  $q_{NO_3^-}$  fue hasta 1.87 veces menor que la obtenida en ausencia de 2-CF a la concentración más baja de glucosa utilizada (Tabla 5.3.2). Estos resultados sugirieron que la presencia del 2-CF afectó de manera más precisa el consumo de nitrato.



**Figura 5.3.4** Ensayos cinéticos del proceso desnitrificante utilizando un cultivo previamente expuesto a 2-CF y otro sin exposición previa al 2-CF en presencia de acetato

#### 5.3.3.4 Ensayos de recuperación

Se realizaron dos ensayos cinéticos adicionales, uno utilizando un inóculo previamente expuesto a 2-CF (72 d) y otro sin exposición al 2-CF usando acetato como fuente reductora. En el cultivo control sin exposición previa al 2-CF, el acetato fue totalmente consumido en 15 h (las  $E_{NO_3^-}$  y  $E_{acetato}$  fueron del 100%), mientras que en el cultivo previamente expuesto a 2-CF, el acetato fue totalmente consumido en 31 h (Figura 5.3.4). En el cultivo previamente expuesto al 2-CF, se observó una disminución del  $Y_{N_2}$  y de la mineralización ( $Y_{HCO_3^-}$ ). De manera similar, fue observada una disminución del 74% en las velocidades específicas de consumo de acetato y nitrato ( $q_{acetato}$  y  $q_{nitrato}$ ), en comparación con el cultivo sin exposición al 2-CF (Tabla 5.3.3). Además, se observó una acumulación de nitrito en ambos ensayos, con valores de  $Y_{nitrito}$  de  $0.42 \pm 0.02$  y  $0.64 \pm 0.012$  para el cultivo sin exposición al 2-CF y con exposición previa al 2-CF respectivamente. La acumulación de nitrito se ha reportado en los cultivos que crecen sobre fenol (Tschech and Fuchs, 1987; Thomas *et al.*, 2002). Meza-Escalante *et al.*, (2008) observaron también una acumulación de nitrito cuando un reactor en continuo fue alimentado con compuestos fenólicos, sugiriendo que la enzima nitrito oxidasa pudiera estar inhibida. Los resultados sugieren que la exposición previa a 2-CF causa una inhibición de la actividad desnitrificante.

**Tabla 5.3.3.** Ensayo de recuperación con acetato usando un cultivo expuesto a 2-CF y un cultivo sin exposición al 2-CF.

Lodo	$Y_{N_2}$ (mg N-N <sub>2</sub> / mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	$Y_{NO_2}$ (mg N- NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> / mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	$Y_{HCO_3}$ (mg C- HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / mg C-acetato)	$q_{\text{acetato}}$ (mg C-acetato / g SSV d)	$q_{NO_3^-}$ (mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / g SSV d)
Sin previa exposición al 2-CF	0.52±0.01	0.42 ± 0.02	0.71 ± 0.01	168.2 ± 1.4	140.6 ± 0.2
Previamente expuesto al 2-CF	0.27 ±0.0006	0.64 ± 0.012	0.59 ± 0.009	43.9 ± 1.4	35.5 ± 5.7

- $E_{NO_3^-}$  y  $E_{\text{acetato}}$  fueron del 100%

### 5.3.4 Conclusiones

El efecto del 2-CF sobre el cultivo fue diferente dependiendo de la fuente del donador de electrones que se utilizó para el proceso desnitrificante. Cuando se utilizó fenol la adición de 2-CF provocó que la actividad desnitrificante disminuyera considerablemente afectando la  $q_{NO_3^-}$  tanto como a la  $q_{fenol}$ , las que disminuyeron 6 y 32.3 veces, respectivamente. Cuando se utilizó glucosa, la  $E_{NO_3^-}$  pasó de 100% a 77.6% en ausencia y presencia del 2-CF, respectivamente. Sin embargo, cuando se utilizó acetato el proceso desnitrificante no se inhibió por la presencia del 2-CF, inclusive en algunos casos se podría decir que se incrementaron las velocidades específicas de consumo tanto de acetato como de nitrato en 2 y 1.36 veces, respectivamente, con respecto al cultivo sin 2-CF. Por otro lado los ensayos de recuperación, indican que periodos largos de exposición al 2-CF pueden ocasionar una disminución de la actividad desnitrificante posterior al contacto, observándose una disminución del 74% de la  $q_{NO_3^-}$  y la  $q_{acetato}$ . Estos resultados muestran que el diseño de la alimentación juega un papel importante en el desempeño del proceso desnitrificante y que debe considerarse para el buen funcionamiento de los sistemas de tratamiento de aguas residuales.

### 5.3.5 Bibliografía

- Bae, H., Yamagishi, T., Suwa, Y. (2002). Evidence for degradation of 2-chlorophenol by enrichment cultures under denitrifying conditions. *Microbiology* **148**, 221-227
- Chang, C., Tseng, S., Chang, Chih., Ho, C. (2003). Reductive dechlorination of 2-chlorophenol in a hydrogenotrophic, gas-permeable, silicone membrane bioreactor. *Biores. Technol.* **90**, 323-328.

- Chang, C., Tseng, S., Chang, Chih., Ho, C. (2004). Degradation of 2-chlorophenol via a hydrogenotrophic biofilm under different reductive conditions. *Chemosphere* **56**, 989-997.
- Dercová, K., Čertík, M., Mal'ová, A., Sejáková, Z. (2004). Effect of chlorophenols on the membrane lipids of bacterial cells. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **54**, 251-254.
- Eiroa, M., Vilar, A., Amor, L., Kennes, C., Veiga, M.C. (2005). Biodegradation and effect of formaldehyde and phenol on the denitrification process. *Water Res.* **39**, 449-455.
- Forman, D. (1991). Nitrate exposure and human cancer. In: Bogardi, I., Kuzelka, R. (eds.) Nitrate Contamination, RD NATO ASI Series. G30 Springer-Verlag..
- Gregus, Z. and Klaassen, C.D. (2001). Mechanisms of toxicity. In Klaassen, C.D. (editor). Casarett and Doull's toxicology, sexta edición. New York: McGraw-Hill. 35-81.
- Häggbloom, M., Rivera, M., Young, L. (1993) Influence of alternative electron acceptors on anaerobic biodegradability of chlorinated phenols and benzoic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1162-1167.
- Keweloh, H., Heipieper, H. (1996). Trans unsaturated fatty acids in bacteria. *Lipids* **31**, 129-137.
- Kolomytseva, M.P., Solyanikova, I.P., Golovlev, E.L., Golovleva, L.A. (2005). Heterogeneity of *Rhodococcus opacus* 1CP as a response to stress induced by chlorophenols. *Appl. Biochem. Microbiol.* **41**, 474-479.
- Liu, X.-W., He, R., Shen, D.-S. (2008). Studies on toxic effects of pentachlorophenol on the biological activity of anaerobic granular sludge. *J. Environ. Management.* **88**, 939-946.
- Martínez-Hernández, S., Texier, A.-C., Cuervo-López, F., Gómez, J. (2011). 2-chlorophenol consumption and its effect on the nitrifying sludge. *J. Hazard Mat.* **185**, 1592-1595.



- Meza-Escalante E., Texier Anne-Claire, Cuervo-López F., Gómez Jorge, Cervantes F. (2008) Inhibition of sulfide on the simultaneous removal of nitrate and *p*-cresol by a denitrifying sludge. *J. of Chemical Technol. and Biotech.* **83**, 372-377.
- Muñoz, H., Armienta, a., Vera, A. (2004). Nitrato en el agua subterráneas a del valle de Huamatla, Tlaxcala, México. Ver. *Int. Contamin. Ambient.* **20**, 91-97.
- OMS, 2003: Chlorophenols in drinking-water., Organización Mundial de la Salud, Ginebra (Suiza) (WHO/SDE/WHS/03.04/47).
- Pepelko, W.E., Gaylor, D.W., Mukerjee, D. (2005). Comparative toxic potency ranking of chlorophenols. *Toxicol. Ind. Health* **21**, 93-111.
- Radniecki, T., Dolan, M., Semprini, L. (2008). Physiological and transcriptional responses of *Nitrosomonas europaea* to toluene and benzene. *Environ. Sci. Technol.* **42**, 4093-4098.
- Satoh, H., Sasaki, Y., Nakamura, Y., Okabe, S., Suzuki, T. (2005). Use of microelectrodes to investigate the effects of 2-chlorophenol on microbial activities in biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* **91**, 133-138.
- Thomas, S., Sarfaraz, S., Mishra, L., Iyengar, L. (2002). Degradation of phenol and phenolic compounds by defined denitrifying bacterial. *World J. of Microbiol. and Biotech.* **18**, 57-63.
- Tschech A. and Fuchs G. (1987). Anaerobic degradation of phenol by culture of newly isolated denitrifying *Pseudomonas*. *Archives of Microbiol.* **148**, 213-217.
- Wang, X., Xing, L., Qui, T., Han, M. (2012). Simultaneous removal of nitrate and pentachlorophenol from simulated groundwater usin a biodenitrification reactor packed with corncob. *Environ. Sci. Res.* DOI 10.1007/s11356-012-1092-9

# CONCLUSIONES GENERALES

## 6. CONCLUSIONES GENERALES

El presente trabajo mostró que el lodo desnitrificante consumió el 2-clorofenol aunque, no fue posible determinar si el consumo del 2-CF estuvo acoplado a la reducción del nitrato. La adición de acetato o fenol aumentó el consumo del 2-CF por el lodo desnitrificante, obteniendo valores superiores para la  $E_{2-CF}$  y  $q_{2-CF}$  comparados con el control sin cosustratos. También, se observó que el acetato fue mejor cosustrato que el fenol con valores más altos para la  $E_{2-CF}$  (hasta 3 veces) y  $q_{2-CF}$  (hasta 5.4 veces) cuando el acetato fue adicionado. Las eficiencias de consumo de los sustratos ( $E_{2-CF}$ ,  $E_{\text{fenol}}$ ,  $E_{\text{acetato}}$ ,  $E_{\text{NO}_3^-}$ ) fueron cercanas al 100%, obteniendo como productos principales del proceso al bicarbonato y  $\text{N}_2$ . El lodo desnitrificante mineralizó simultáneamente al 2-CF, fenol o acetato, y redujo el nitrato a  $\text{N}_2$ .

En ausencia de nitrato, la adición de un donador de electrones mejoró el consumo del 2-CF comparado con el control sin donador de electrones. El comportamiento metabólico y cinético del lodo en presencia de acetato, fenol o glucosa, en el mismo intervalo de concentraciones fue diferente. Los resultados sugirieron que el tipo de donador de electrones, más que su concentración, determina los valores de la eficiencia, rendimiento y velocidades específicas y no dependen de su similitud con el 2-CF. La  $q_{2-CF}$  y la  $E_{2-CF}$  obtenidas con la adición de acetato fueron hasta 8.4 y 3.4 veces más altas, respectivamente, en comparación con el control. Entonces, la adición de un sustrato de fácil oxidación podría ser una alternativa apropiada para la eliminación de compuestos recalcitrantes como los clorofenoles sin que sea necesario un proceso previo de adaptación al compuesto.

En el proceso desnitrificante, el efecto de la adición de 2-CF fue diferente dependiendo de la fuente de electrones empleada. Cuando se utilizó fenol, la adición de 2-CF provocó que la actividad desnitrificante disminuyera considerablemente afectando la  $q_{\text{NO}_3^-}$  tanto como la  $q_{\text{fenol}}$ , las cuales disminuyeron hasta 6 y 32.3 veces respectivamente. Cuando se utilizó glucosa la  $E_{\text{NO}_3^-}$  pasó del 100% al 77.6% en ausencia y

presencia del 2-clorofenol, respectivamente. Sin embargo, cuando se utilizó acetato, el proceso desnitrificante no fue afectado con la presencia del 2-CF. Por otro lado los ensayos de recuperación, indicaron que periodos largos de exposición al 2-CF pueden ocasionar una disminución de la actividad desnitrificante posterior al contacto, observándose una disminución del 74% de la  $q_{\text{NO}_3^-}$  y la  $q_{\text{acetato}}$ . Estos resultados muestran que el diseño de la alimentación juega un papel importante en el desempeño del proceso desnitrificante y que debe considerarse para el buen funcionamiento de los sistemas de tratamiento de aguas residuales.

## 7. RECOMENDACIONES

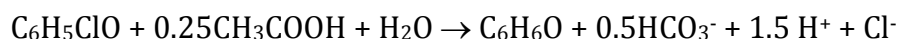
En muchos de los procesos microbiológicos la velocidad de reacción puede ser directamente proporcional a la concentración de biomasa presente en el sistema ( $r = -dS/dt = q_s [X]$ ). En el presente trabajo, se observó que el consumo del 2-CF fue lento, además con un tiempo de consumo prolongado. Una posible propuesta para contender este inconveniente podría ser la evaluación de diferentes configuraciones de reactores con una alta densidad celular y de esta manera, tener una mayor velocidad volumétrica de consumo del 2-CF. El estudio y evaluación de un reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente (UASB: Upflow Anaerobic Sludge Blanket) podría ser una alternativa atractiva, ya que opera con concentraciones altas de biomasa. Además, tiene la ventaja de que ha sido aplicado a una gran variedad de aguas residuales con éxito, es de fácil operación y bajo costo. Uno de los puntos más atractivos del reactor UASB es que puede ser operado a TRH cortos, lo que permite la construcción de unidades compactas de tratamiento. Otra configuración como alternativa podría ser la utilización de un biofiltro anaerobio, el cual proporciona un sistema de lodos suspendidos y al mismo tiempo suministra un medio de soporte a los microorganismos. Evita el lavado de los microorganismos y de esta manera se incrementa el tiempo de retención de sólidos. La mayor parte de la biomasa se encuentra adherida entre los macroporos del relleno. Usualmente es operado a TRH cortos.

La utilización de un reactor de lotes secuenciados (SBR: sequencing batch reactor) también se presenta como una buena alternativa. El reactor SBR es un sistema discontinuo, el cual es operado mediante ciclos consecutivos. Cada ciclo consta de 4 etapas, inicia con el llenado del tanque, después se lleva a cabo el periodo de reacción biológica, seguida por un periodo de sedimentación y por último se lleva a cabo el drenado del reactor. El SBR presenta diferentes ventajas una de ellas es la versatilidad para tratar diferentes tipos de agua, bajos costos de operación, largos tiempo de

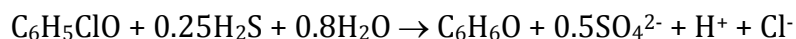
retención celular y el ahorro de espacio. Además se ha reportado que al incrementar el número de ciclos generalmente se incrementa la velocidad de consumo del contaminante.

En cualquier caso, es recomendable, caracterizar fisiológicamente el proceso, en términos de velocidades de consumo, eficiencias y rendimientos, y analizar los resultados obtenidos para definir si es conveniente o no, la utilización de dicho sistema, en base a las necesidades que se desean cubrir, es decir, se puede tener eficiencias altas pero rendimientos bajos o velocidades altas pero eficiencias bajas, etc.

Por otra parte, en el presente trabajo se aportó evidencias de que el tipo donador de electrones utilizado tiene un efecto sobre la velocidad y tiempo de consumo del 2-CF. Por lo que sería recomendable utilizar otros sustratos, que en otros estudios han mostrado ser una fuente excelente de poder reductor. Con la finalidad de tener suficiente poder reductor para que la descloración reductiva se realice, el sulfuro podría ser una opción adecuada, además, este tipo de compuesto está presente en una gran cantidad de efluentes, entre ellas la industria petroquímica. Con esto, además de eliminar el 2-CF, podría ser eliminado el sulfuro que, a su vez, también es un compuesto muy tóxico. Los resultados obtenidos en esta tesis, mostraron que el acetato fue el donador de electrones con el que se obtuvieron las velocidades más altas de consumo. Si se comparan las  $\Delta G^{\circ}$  de la reacción entre el sulfuro y el acetato para la reducción del 2-CF a fenol, se podrá ver que son valores muy semejantes, tal como se observa en las siguientes ecuaciones:



$$\Delta G^{\circ} = -131.33$$



$$\Delta G^{\circ} = -101.1$$

Esto sugiere que el equilibrio de la reacción se desplaza hacia la formación de productos, así que la utilización del sulfuro podría ser una alternativa viable.

Asimismo, es también recomendable conocer la estructura de la comunidad y obtener información microbiológica de las poblaciones que componen la comunidad, saber si se relacionan entre sí y cómo. Así como conocer su respuesta a los cambios ambientales, es decir, determinar los cambios en abundancia y distribución de los microorganismos. Es probable que este estudio, permita entender de mejor manera, las diferencias encontradas en la respuesta fisiológica del inóculo con los diferentes sustratos alternos utilizados y quizás se pueda relacionar la respuesta fisiológica del consorcio con algún grupo microbiano. Este se puede realizar con ayuda de distintos métodos de biología molecular como DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) o FISH (Fluorescent In Situ Hybridization), los cuales permitirán seguir los cambios en las poblaciones del consorcio cuando se modifiquen las condiciones ambientales.

De igual forma también sería conveniente aislar, identificar y caracterizar a los microorganismos capaces de consumir al 2-CF. Esto se podría llevar a cabo utilizando técnicas de microbiología clásica y herramientas de biología molecular. Conocer las capacidades fisiológicas metabólicas de los microorganismos aislados y conocer su tolerancia al 2-CF puede ser de mucho interés científico. En este mismo contexto, es conveniente tener información sobre los mecanismos de transporte y el efecto del clorofenol sobre las membranas celulares. Asimismo, tener información sobre las enzimas involucradas en el proceso de consumo, los mecanismos de reacción.