

Universidad Autónoma Metropolitana

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Biotecnología



Casa abierta al tiempo

“Degradación de metacrilatos bajo condiciones anaerobias”

Tesis

Que para obtener el grado de
Maestro en Biotecnología

Presenta

Biól. *Norberto Ulises García Cruz*

Comité Tutorial:

Directora: Dra. Mónica Alicia Meraz Rodríguez

Asesoras: Dra. Laura Georgina Calva Benítez

M. en B. María del Carmen Fajardo Ortíz

MÉXICO, D.F., SEPTIEMBRE 2006

Iztapalapa, D. F., a 7 de septiembre del 2006

El H. Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, **aprobó** la tesis

DEGRADACIÓN DE METACRILATOS BAJO CONDICIONES ANAEROBIAS

Que presentó

Biol. Norberto Ulises García Cruz

Comité Tutorial

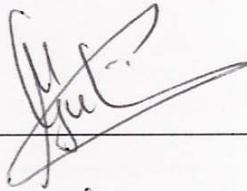
Dra. Mónica Alicia Meraz Rodríguez
Directora, UAM-Iztapalapa

Dra. Laura Georgina Calva Benítez
Asesora, UAM-Iztapalapa

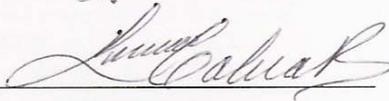
M. en B. María del Carmen Fajardo Ortiz
Asesora, UAM-Iztapalapa

Jurado

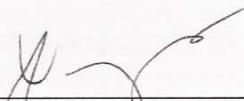
Dr. Mariano Gutiérrez Rojas
Presidente, UAM-Iztapalapa



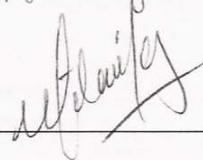
Dra. Laura Georgina Calva Benítez
Secretaria, UAM-Iztapalapa



Dr. Alejandro Vargas Casillas
Vocal, UNAM



Dra. Zhenia Milán Fernández
Vocal, UAM-Iztapalapa



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Tratamiento de Aguas Residuales y Microbiología Ambiental W-106, del Grupo de Ciencia y Tecnología Ambiental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Fue financiado a través de la beca número 181013 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa está incluida en el padrón Nacional de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y además cuenta con apoyo del mismo Consejo con el número de registro 0471-0.

Contenido

	Pag.
Agradecimientos.....	I
Dedicatorias.....	II
Lista de Tablas.....	III
Lista de Figuras.....	IV
Notación.....	VI
Resumen.....	VII
Abstract.....	VIII
1. Introducción.....	1
1.1 Perspectiva actual.....	1
1.2 Metacrilatos.....	3
1.2.1 Aplicaciones.....	3
1.2.2 Propiedades.....	5
1.2.3 Toxicidad de metacrilatos.....	8
1.3 Digestión anaerobia.....	11
1.3.1 Acidogénesis: hidrólisis y fermentación.....	13
1.3.2 Acetogénesis.....	15
1.3.3 Metanogénesis.....	19
1.4 Polihidroxicanoatos (PHA).....	22
2. Justificación.....	24
3. Objetivos.....	26
4. Materiales y Métodos.....	27
4.1 Inóculo.....	27
4.1.1 Activación del lodo.....	28
4.2 Actividad Metanogénica Específica (AME).....	28
4.3 Cálculo de la DQO teórica.....	30
4.4 Cinéticas.....	31
4.4.1 Cinéticas de degradación de compuestos.....	31
4.4.2 Velocidad específica de consumo de sustrato.....	32
4.4.3 Cinéticas de toxicidad para determinar concentraciones inhibitorias (CI ₅₀).....	33
4.4.4 Preparación de muestras para análisis en cromatografía de gases.....	34
4.4.5 Balances de carbono.....	34
4.5 Técnicas analíticas.....	34
4.5.1 Cuantificación de sustratos e intermediarios.....	34
4.5.2 Cuantificación de metano y bióxido de carbono.....	35
4.6 Determinación de sólidos suspendidos volátiles.....	36

4.7 Carbono orgánico e inorgánico.....	37
4.8 pH.....	37
4.9 Presión parcial de hidrógeno.....	37
4.10 Tinción de polihidroxitirato (PHB).....	38
5. Resultados y Discusión.....	39
5.1 Cinética de degradación de ácido metacrílico.....	40
5.1.1 Ácido metacrílico.....	40
5.1.2 Dióxido de carbono y metano.....	43
5.1.3 Balance de carbono y formación de polihidroxitirato (PHB).....	43
5.2 Cinética de degradación ácido metacrílico con H ₂ :CO ₂	46
5.2.1 Ácido metacrílico.....	46
5.2.2 Dióxido de carbono y metano.....	49
5.2.3 Balance de carbono y formación de polihidroxitirato (PHB).....	50
5.3 Cinética de degradación en mezcla de metil, etil y butil metacrilato.....	51
5.3.1 Metil, etil y butil metacrilato.....	51
5.4 Cinética de degradación ácido metacrílico y alcoholes.....	53
5.4.1 Ácido metacrílico, metanol, etanol y butanol.....	53
5.4.2 Dióxido de carbono y metano.....	56
5.4.3 Balance de carbono y formación de polihidroxitirato (PHB).....	57
5.5 Toxicidad de Metacrilatos.....	59
6. Conclusiones.....	64
7. Bibliografía.....	66
8. Anexos.....	71

Agradecimientos

A la Doctora Mónica Meraz Rodríguez, por compartir su conocimiento, experiencia y amistad durante la realización de este trabajo.

A la Doctora Laura Calva Benítez por su asesoría y su valiosa ayuda en la escritura y redacción de la tesis. Gracias.

A la M. en B. Carmen Fajardo por sus aportación de ideas y asesoría en las técnicas analíticas. Gracias.

Al Dr. Alejandro Vargas, Dr. Héctor Poggy y Dr. Mariano Gutiérrez por su objetiva y oportuna revisión de la tesis. Gracias.

A la Dra. Florina Ramírez por su disposición y comentarios. Gracias.

A la Dra. Patricia Castilla por compartir sus experiencias, comentarios y conocimientos. Gracias.

A todos los compañeros del laboratorio W-106 Javier, Sergio, Lourdes, Huizache, Xitlalli, Gehovana, Sergiño, Edgar, Ulises Duran, Juan Carlos y Zhenia. Gracias por todos los momentos tan agradables dentro y fuera de la UAM.

Dedicatorias

A mi madre

Martha Cruz

*Por darme todo su amor, apoyo y enseñarme
que uno nunca se debe de rendir*

A mi padre

Flavio García

Por compartir todas sus experiencias

A mis hermanos

Flavio, Gerardo y Arlett

Gracias por su apoyo, compañía, amistad y cariño

A Neith

Gracias por todo tu apoyo y cariño

Te amo

Lista de Tablas

	Pag.
Tabla 1.1	Aplicaciones de los metacrilatos 4
Tabla 1.2	Propiedades físico-químicas de los metacrilatos 6
Tabla 1.3	Datos de toxicidad y ecotoxicidad..... 9
Tabla 1.4	Bacterias hidrolíticas que intervienen en la digestión anaerobia.... 14
Tabla 1.5	Bacterias sintróficas acetogénicas (OHPA)..... 15
Tabla 1.6	Reacciones asociadas a la acetogénesis..... 17
Tabla 1.7	Bacterias identificadas capaces de isomerizar el ácido isobutírico. 19
Tabla 1.8	Géneros de bacterias que participan en la metanogénesis..... 20
Tabla 4.1	Valor de la DQO teórica para cada compuesto..... 31
Tabla 4.2	Relación másica de las cinéticas..... 32
Tabla 4.3	Concentraciones utilizadas para determinar la toxicidad..... 33
Tabla 5.1	Carbono recuperado a diferentes tiempos de la cinética..... 44
Tabla 5.2	Carbono recuperado durante la degradación 50
Tabla 5.3	Concentraciones de metacrilatos..... 51
Tabla 5.4	Velocidad específica de consumo del ácido metacrílico en las diferentes cinéticas..... 55
Tabla 5.5	Carbono recuperado a diferentes tiempos 57
Tabla 5.6	Concentraciones inhibitorias CI_{50} de los metacrilatos..... 62
Tabla 5.7	CI_{50} y estructura química de los metacrilatos..... 62

Lista de Figuras

	Pag.
Figura 1.1 Estructura general de los metacrilatos. Polimerización del metil metacrilato para obtener polimetilmetacrilato.....	5
Figura 1.2 Compuesto carbonílico α , β -no saturado, sistema conjugado.....	6
Figura 1.3 Ruta biológica de la mineralización del metil metacrilato.....	8
Figura 1.4 Etapas y rutas metabólicas de la digestión anaerobia.....	12
Figura 1.5 Modelo de distribución microbiana en gránulos anaerobios.....	15
Figura 1.6 Ruta metabólica del isobutírico.....	18
Figura 1.7 Producción de ATP en arqueobacterias metanogénicas.....	21
Figura 1.8 Estructura general de los PHA.....	23
Figura 4.1 Esquema del trabajo experimental.....	27
Figura 4.2 Cuantificación de metano por desplazamiento de solución de NaOH al 3%.....	29
Figura 4.3 Gránulos de PHB en color naranja teñidos con Azul de Nilo.....	38
Figura 5.1 Degradación de ácido metacrílico y producción de biogás.....	40
Figura 5.2 Ruta metabólica de la mineralización del ácido metacrílico.....	41
Figura 5.3 Secuencia del transporte de electrones en las bacterias <i>Geobacter sulfurreducens</i> y <i>Wolinella succinogenes</i>	42
Figura 5.4 Gránulos de PHB teñidos con Azul de Nilo.....	45
Figura 5.5 Ruta de la degradación del ácido butírico por β -oxidación en <i>Syntrophomonas wolfei</i>	46
Figura 5.6 Degradación del ácido metacrílico en presencia de hidrógeno.....	47
Figura 5.7 Producción de dióxido de carbono y metano en presencia de H_2	49

	Pag.
Figura 5.8 Degradación de la mezcla de metacrilatos.....	52
Figura 5.9 Degradación de ácido metacrílico y alcoholes.....	53
Figura 5.10 Reacciones implicadas en la degradación del ácido metacrílico y alcoholes.....	54
Figura 5.11 Formación de dióxido de carbono y metano.....	56
Figura 5.12 Fotografía de fluorescencia de microorganismos provenientes de la cinética de ácido metacrílico y alcoholes.....	58
Figura 5.13 Fotografías de microscopía de una bacteria.....	58
Figura 5.14 Concentración de butil metacrilato a la que se inhibe el 50%.....	59
Figura 5.15 Concentración de etil metacrilato a la que se inhibe el 50%.....	60
Figura 5.16 Concentración inhibitoria del metil metacrilato y ácido metacrílico...	61

Notación

AB	Ácido butírico
Ace	Acetato
acetil-CoA	Acetil coenzima A
AI	Ácido isobutírico
AM	Ácido metacrílico
AME	Actividad metanogénica específica
atm	Atmósferas
ADP	Adenosindifosfato
ATP	Adenosintrifosfato
BM	Butil metacrilato
But	Butanol
Bv	Carga orgánica volumétrica
Cl₅₀	Concentración de tóxico que inhibe la actividad metanogénica en un 50%
Cit_c	Citocromo "c"
Cit_b	Citocromo "b"
CL₅₀	Concentración letal 50
CoB	Coenzima "b"
CoM	Coenzima "m"
COT	Carbono orgánico total
DL₅₀	Dosis letal 50
DQO	Demanda química de oxígeno
DQO-CH₄	Metano equivalente en DQO
EM	Etil metacrilato
Eta	Etanol
HG	Hidrogenasa
Koc	Coefficiente de partición carbono-orgánico/agua
Met	Metanol
META_{reduc}	Metacrilato reductasa
Mk	Menaquinona
MM	Metil metacrilato
NAD⁺	Nicotinamida adenín dinucleótido
PHB	Polihidroxiacetato
r_{Ace}	Reacción hidrólisis de acetato
r_{AB-Ace}	Reacción ácido butírico-acetato
r_{AB-PHB}	Reacción ácido butírico-polihidroxiacetato
r_{AI}	Reacción ácido isobutírico
r_{AM}	Reacción ácido metacrílico
r_{But}	Reacción butanol
r_{Eta}	Reacción hidrólisis etanol
r_{Met}	Reacción metanol
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
TRH	Tiempo de residencia hidráulica
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket
V_{ec}	Velocidad específica de consumo o hidrólisis

García Cruz Norberto Ulises (2006). Degradación de metacrilatos bajo condiciones anaerobias. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México.

Resumen

Se estudió la degradación en lote de metacrilatos (metil, etil y butil metacrilato) y ácido metacrílico y la toxicidad de estos compuestos en condiciones anaerobias utilizando lodo proveniente de una planta de malteo, así como el efecto de los intermediarios generados por la hidrólisis de los ésteres sobre la velocidad de degradación del ácido metacrílico.

Las pruebas se llevaron a cabo en botellas serológicas de 60 mL, utilizando medios minerales para los ensayos de degradación y para los experimentos de toxicidad. El lodo se activó por un periodo de 15 días en un reactor UASB de 2.5 L, alimentado con una mezcla de glucosa y acetato a concentración de $1 \text{ gDQO}\cdot\text{L}^{-1}$. En las pruebas de degradación se evaluó una mezcla de ésteres de metacrilato, ácido metacrílico (AM) y ácido metacrílico adicionado con H_2 (AM+ H_2) o alcoholes (AM+Alc). Los sustratos, intermediarios y biogás se cuantificaron por cromatografía de gases. Las pruebas de toxicidad se evaluaron sobre la actividad metanogénica acetoclástica (AMA) y se determinó la concentración inhibitoria de tóxico, que disminuye en un 50% la AMA (CI_{50}).

En las pruebas de degradación de los metacrilatos se observó que el primer paso es la hidrólisis del enlace éster, generando ácido metacrílico y el alcohol correspondiente. Se encontró que la presencia de alcoholes (metanol, etanol y butanol) incrementó la velocidad específica de consumo de ácido metacrílico ($0.063 \text{ gSus}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) en comparación con la prueba para AM ($0.015 \text{ gSus}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) y AM+ H_2 ($0.017 \text{ gSus}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). Durante los ensayos de AM+ H_2 y AM+Alc se detectó acetato, el cual modificó la velocidad de consumo del ácido metacrílico, lo que difiere de lo reportado en la literatura. En las pruebas de AM y AM+Alc, se observó una falta de carbono aproximada del 60%, que fue utilizado para la síntesis de polihidroxibutirato, como se constató en observaciones al microscopio de luz tiñendo el biopolímero con Azul de Nilo. Los resultados de la CI_{50} para el butil, etil, metil metacrilato y ácido metacrílico, fueron 0.95, 3.75, 27.82 y $31.47 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente, indicando que conforme el número de carbonos aumenta en el alcohol del éster, el compuesto es más tóxico.

García Cruz Norberto Ulises (2006). Metacrylates degradation in anaerobic conditions. Master Thesis from Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México.

Abstract

The biodegradation and toxicity effect of methacrylates (methyl, ethyl, butyl methacrylate) and methacrylic acid under anaerobic conditions was studied in batch systems, using non acclimated granular sludge from the malting industry. The effect of the intermediaries generated by the ester bond hydrolysis in the degradation rate of the methacrylic acid was also studied.

The tests were carried out in serologic bottles, using mineral media for the biodegradation and toxicity essays. The sludge was activated for of 15 days in a 2.5L UASB reactor, by feeding it with a mixture of glucose and acetate at $1 \text{ gCOD}\cdot\text{L}^{-1}$. During the degradation tests, mixtures of methacrylate esters, methacrylic acid (AM) and methacrylic acid amended with H_2 (AM+ H_2) or alcohols (AM+Alc) were evaluated. The substrates, intermediaries and biogas were quantified by gas chromatography. The toxicity essays were evaluated on the decrease in 50% of the methanogenic aceticlastic activity (AMA) and the inhibitory concentration of the toxic was determined (IC_{50}).

The methacrylates degradation tests showed that the first step was the ester bond hydrolysis, that generated methacrylic acid and its corresponding alcohol. The addition of alcohols such as methanol, ethanol and butanol, increased the consumption specific rate of methacrylic acid ($0.063 \text{ g}\cdot\text{gVSS}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) compared with the AM ($0.015 \text{ g}\cdot\text{gVSS}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) and AM+ H_2 essays ($0.017 \text{ g}\cdot\text{gVSS}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). Acetate production was detected during AM+ H_2 y AM+Alc essays, but did not modified the consumption rate of methacrylic acid, which differs with other reports. In AM and AM+Alc tests, it was observed a lack of carbon approximately of 60%, that was used for the production of polihydroxybutyric acid, an energy stock biopolymer synthesized by fermentative bacteria, and was confirmed by fluorescence microscopic observations, when the biopolymer was dyed with Nile Blue. The IC_{50} results for the butyl, ethyl, methyl methacrylates and methacrylic acid were 0.95, 3.75, 27.82 y $31.47 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively, indicating that as the number of carbons of the alcoholic chain in the ester structure increased, the toxicity increased as well.

1. Introducción

1.1 Perspectiva Actual

En los últimos años las descargas de compuestos orgánicos al ambiente se han incrementado, favoreciendo la contaminación de ríos, océanos y mantos freáticos, y representando un peligro para la vida silvestre de estos ecosistemas. Un compuesto orgánico tóxico se define como una sustancia que es peligrosa tanto para los humanos como para otro tipo de vida (Liu *et al.*, 2004). En algunas instancias el peligro se agrava, debido a que algunos compuestos orgánicos pueden reaccionar con el agua, suelo y la luz, propiciando la formación o transformación de compuestos con mayor toxicidad y la capacidad de bioacumularse (Danssonville y Renault, 2002), favoreciendo que se fijen en plantas y tejidos de animales, produciendo con el paso del tiempo, daños en el sistema reproductivo o en el caso, más grave cambios en el material genético de los animales (CICADS 4, 1998)

La mayoría de los compuestos orgánicos volátiles encontrados en los cuerpos de agua provienen de la industria química, petroquímica, electrónica y de refinación, siendo en los procesos de manufactura y producción donde se genera la mayor cantidad. Aunado a esto, los lodos provenientes de la purga de las plantas de tratamiento de aguas contienen una gran cantidad de tóxicos orgánicos, los cuales incrementan la contaminación de los mantos freáticos al ser lavados por el efecto de la lluvia cuando han sido depositados al aire libre.

En la actualidad se utilizan cerca de siete millones de compuestos orgánicos, cifra que se va incrementando debido al avance tecnológico en ingeniería química, industria petroquímica, así como en el desarrollo de herbicidas, insecticidas y fertilizantes, siendo la

actividad humana y las plantas industriales las que producen la mayoría de los tóxicos orgánicos (Liu *et al.* 2004).

En 1989 en los Estados Unidos, la EPA (Environment Protection Agency) realizó un estudio en 1,671 plantas de tratamiento de agua residual, las cuales comprenden el 87% de las plantas en ese país, y son responsables de descargar 11,000 toneladas de compuestos orgánicos al año, entre los que se encuentran: tricloroetileno, percloroetileno, metil cloruro, cloroformo y acrilonitrilo entre otros (WEF-ASCE, 1995). Para México no hay datos sobre las descargas de compuestos orgánicos al medio ambiente. Monroy *et al.* (2000) reportaron que sólo el 21% de los efluentes provenientes de la industria química son tratados.

Durante la fabricación o formulación de pinturas se generan residuos líquidos provenientes del lavado de estanques y reactores. Estos contienen subproductos de los condensados de los reactores, así como sosa y solventes utilizados tanto para el lavado como para la fabricación de aceites, resinas, plastificadores, pigmentos, ampliadores y secadores. En un estudio llevado a cabo en la ciudad de Santiago de Chile se reportó que este tipo de efluentes presenta una DQO de $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ debido a la presencia de las sustancias orgánicas utilizadas (estirenos, acetonas, xilenos, bencenos, fenoles, acrílicos, etc.), además de contener restos de metales pesados provenientes de los pigmentos utilizados (cromo, plomo, mercurio, níquel y zinc) (CNMA, 1998).

Estos residuos líquidos son tratados por procesos físico-químicos, lo que genera la producción de residuos sólidos que pueden ser clasificados como residuos químicos peligrosos, los cuales son dispuestos en vertederos o son envasados para su confinamiento. Otros sectores que contribuyen a la contaminación con sustancias de este tipo son la automotriz y la química, así como los hospitales y las tintorerías. Lo anterior no

será permitido en el futuro y el destino final de estos residuos es el problema al que se enfrenta estas industrias y la de la pintura (Nemerow y Dasgupta, 1998).

1.2 Metacrilatos

1.2.1 Aplicaciones

El metil metacrilato ($C_5H_8O_2$) se usa principalmente para la fabricación del polimetilmetacrilato (PMMA), que es un plástico con una alta resistencia, además de ser incoloro, lo que le permite ser teñido del color deseado para la elaboración de bañeras, fregaderos, anuncios luminosos, cristalería y autopartes. En la medicina se utiliza en lentes intraoculares y de contacto, así como en implantes (CEPA 1999). Los co-polímeros del metil metacrilato están formados por cadenas lineales que se ablandan cuando son calentados, por lo que se les conoce como termoplásticos (Morrison y Boyd, 1985). Gracias a esta propiedad se pueden moldear o extruir, y por lo tanto son utilizados en acquarelas, solventes, adhesivos, selladores, recubrimientos para piel y telas, tintas, abrillantadores para piso, prótesis dentales, cementos quirúrgicos, en la preparación de uñas postizas y en prótesis ortopédicas para calzado (Tabla 1.1).

En un estudio de mercado realizado en los Estados Unidos de América se reportó que, de la producción de metil metacrilato en 1991, el 24% se utilizó para la fabricación de moldes y láminas acrílicas, el 21% para envases y resinas, 18% para recubrimientos, 10% para modificadores, 8% para emulsiones poliméricas, 3% para láminas con base mineral, 2% para fabricación de metacrilatos, 2% para fibras sintéticas y solo el 11% de la producción se exportó. La producción de metil metacrilato a nivel mundial en 1988 se estimó en 1.4 millones de toneladas. En Estados Unidos, Japón y la Unión Europea en el periodo de 1990 a 1993 fue de 536 000, 403 000 y 447 000 toneladas respectivamente. (CICAD 4, 1998). En México, esta reportado que en el año de 1998 se utilizaron 19,458

toneladas para la fabricación de diversos productos, de las cuales 17,364 se produjeron en el país y sólo se importaron 2,094 toneladas (INEGI, 1999).

Con el etil-metacrilato se fabrican polímeros para la industria aeroespacial, automotriz, de la construcción y la fabricación de muebles, así como resinas para recubrimientos de pinturas, lentes de contacto y emulsiones acrílicas. El butil-metacrilato, se emplea principalmente como monómero para la fabricación de solventes como recubrimientos acrílicos, adhesivos, pegamentos, aditivos de aceites, emulsiones en textiles, pieles y para el acabado de papeles. Como polímero se usa para la fabricación de resinas dentales y componente de pesticidas y en copolímero para embeber la parafina (HSDB, 2006). Entre los mayores productores a nivel mundial de metacrilatos se encuentran las siguientes compañías: Atocina, BASF, Cyro, Dow Chemical, ICI, Lucite, Celanese, Rohm and Hass y Sumitomo (CICAD 4, 1998; HSDB, 2006).

Tabla 1.1 Aplicaciones de los metacrilatos (CICAD 4, 1998; HSDB, 2006).

Compuesto	Usos	Producción a nivel mundial
Metil-metacrilato	Acrílicos, cristalería, anuncios luminosos, lentes de contacto implantes, recubrimientos, solventes selladores, etc.	1,400,000 toneladas (1998)*
Etil-metacrilato	Construcción, automovilismo, aeroespacial, recubrimientos, etc.	NR
Butil-metacrilato	Textiles, pieles, adhesivos, resinas dentales, pesticidas, aditivo para aceites, etc.	NR

*CICAD: Concise International Chemical Assessment Document # 4, 1998.

HSDB: Hazardous Substances Data Bank (2006).

NR = no reportado.

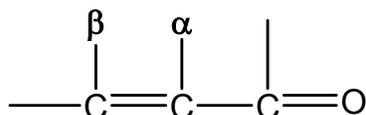
Tabla 1.2 Propiedades físico-químicas de los metacrilatos (HSDB, 2006; EPA, 1998).

Compuesto	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Presión de vapor (mmHg)	Gravedad específica	Solubilidad
Ácido metacrílico	16	163	1.0 (25.5)	1.015 (20°C)	89.0 g·L ⁻¹ (25°C)
Metil metacrilato	- 48	100-101	38.5 (25°C)	0.944 (20°C)	15.0 g·L ⁻¹ (30°C)
Etil metacrilato	- 75	118-119	15.0 (20°C)	0.911 (25°C)	5.6 g·L ⁻¹ (20°C)
Butil metacrilato		163	4.9 (20°C)	0.895 (20°C)	60 mg·L ⁻¹

HSDB: Hazardous Substances Data Bank (2006).

EPA: Environmental Protection Agency U.S. (1998).

Químicamente están clasificados como compuestos carbonílicos α , β -no saturados (Figura 1.2), debido a que tienen un doble enlace carbono-carbono y un doble enlace carbono-oxígeno. Por tal motivo, pueden presentar propiedades tanto de un éster como de una cetona. Los grupos funcionales están separados por un enlace carbono-carbono lo que se conoce como un sistema conjugado. A causa de esta conjugación, estas sustancias no sólo presentan las propiedades de las funciones individuales, sino también otras (Morrison y Boyd, 1985).

**Figura 1.2** Compuesto carbonílico α , β -no saturado, sistema conjugado.

Este tipo de moléculas pueden presentar en el doble enlace carbono-carbono la adición electrofílica de ácidos y halógenos, hidrogenación e hidroxilación típicas de un éster o una cetona no saturados, mientras que en el grupo carbonilo se puede llevar a cabo la sustitución nucleofílica de un éster o la adición nucleofílica de una cetona. Por otra parte, gracias al sistema conjugado que les permite la adición electrofílica y nucleofílica en

el doble enlace carbono-carbono, pueden dar origen a diferentes compuestos (Morrison y Boyd, 1985).

La hidrólisis del enlace éster por medio de reacciones químicas requiere de condiciones especiales para llevarse a cabo, caso contrario a lo que sucede en los procesos biológicos, en donde los microorganismos son capaces de llevar a cabo la hidrólisis del enlace éster en diferentes tipos de moléculas orgánicas α , β -no saturados (Speece, 1996). Castilla *et al.* (2004) estudiaron la degradación de ésteres de acetato y acrilato bajo condiciones anaerobias y encontraron que para ambos grupos de compuestos la mineralización iniciaba con la hidrólisis del enlace éster. En otro estudio (Shtarkman *et al.*, 1993) trataron un efluente proveniente de la fabricación de acrílicos por digestión anaerobia, que contenía metil metacrilato, el cual se degradaba a ácido metacrílico y metanol debido a la hidrólisis del enlace éster (Figura 1.3). El ácido metacrílico fue transformado en ácido isobutírico y después isomerizado a butírico, lo que sugiere la degradación por β -oxidación. Por su parte, el metanol se puede mineralizar a CH_4 ó acetato (Bhatti *et al.*, 1996). Estas reacciones se llevaron a cabo en condiciones de mesofilia y pH neutro.

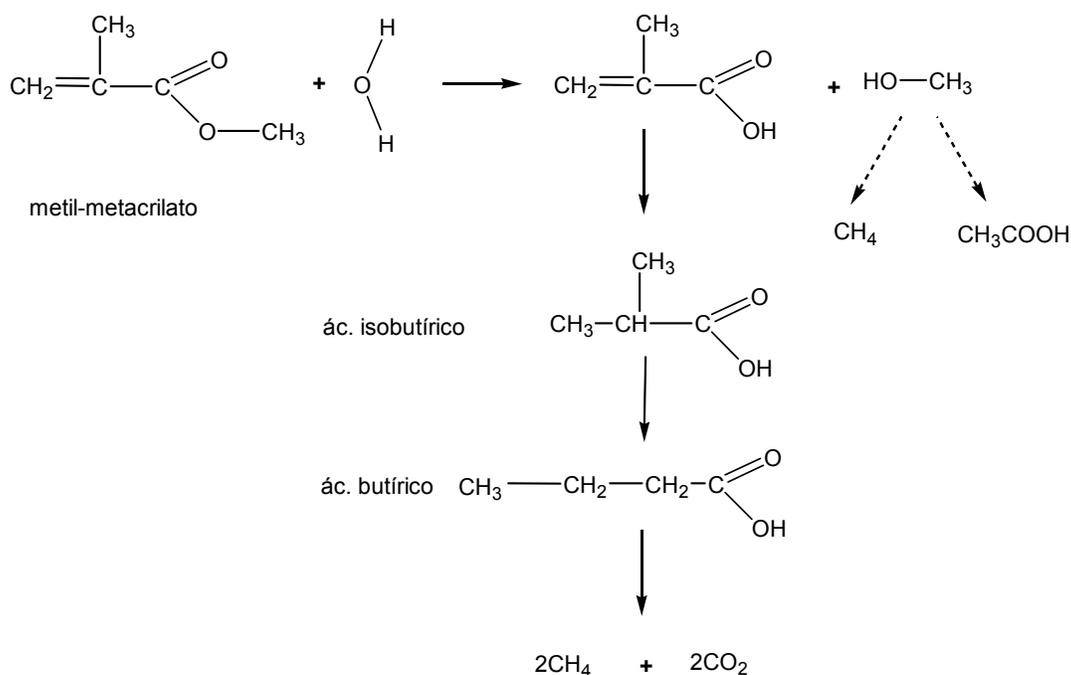


Figura 1.3 Ruta biológica de la mineralización del metil metacrilato propuesta por Shtarkman *et al.* (1993 y 1995).

1.2.3 Toxicidad de metacrilatos

Se han detectado concentraciones de metil metacrilato que van de 5 a 20 mg·L⁻¹ en los efluentes provenientes de la industria para la fabricación de pinturas a base de resinas acrílicas, debido al proceso de lavado de equipo y contenedores de transporte (Liu *et al.* 2004). Siendo esta la principal vía por la cual llegan los metacrilatos al ambiente, por otra parte el transporte, almacenaje, la aplicación de resinas acrílicas, polvo de polimetacrilato, etc., son también fuente de contaminación (HSDB, 2006). En el caso del etil y butil metacrilato no hay reportes en la literatura sobre las concentraciones presentes en los efluentes.

Respecto a los efectos del metil metacrilato se reportó que es tóxico en forma de polímero o monómero. Se ha observado que en periodos cortos de exposición y en concentraciones que van de 0.4 a 1.5 mg·L⁻¹ de aire puede afectar el sistema nervioso

produciendo dolor de cabeza, aletargamiento, mareos, así como sensación de pesadez en brazos y piernas, en el sistema respiratorio puede causar sofocamiento, distrofia, tos, irritación nasal y jadeo en una concentración de $374 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de aire (EPA, 1998)(Tabla 1.3). A largo plazo puede causar dermatitis, disminución en las funciones olfatorias e irritación en los ojos; se ha visto que a altas concentraciones puede producir edema pulmonar e incluso consecuencias fatales (HSDB, 2006).

Tabla 1.3 Datos de toxicidad y ecotoxicidad de los metacrilatos.

Compuesto	Efectos en la salud	DL ₅₀ * (g·kg ⁻¹)	Capacidad para bioacumularse	Capacidad de absorción en sólidos (Koc)
Metil metacrilato	Irritación en piel, ojos y membranas mucosas, fatiga, dolor de cabeza, entre otros padecimientos.	9.4	baja	baja
Etil metacrilato		14.8	baja	baja
Butil metacrilato		22.6	moderada	moderada

HSDB: Hazardous Substances Data Bank, 2006.

*La DL₅₀ fue calculada en ratas.

En un estudio llevado a cabo en trabajadores que estuvieron expuestos al metil metacrilato en un intervalo de concentraciones de 0.4 a $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de aire, se observaron diferentes padecimientos como: dolor de cabeza y extremidades, fatiga, perturbación del sueño, pérdida de la memoria e irritabilidad (HSDB, 2006). En el caso del etil y butil metacrilato, son menos tóxicos para el humano que el metil metacrilato, ambos compuestos producen efectos como son: irritación, depresión y en contacto directo o con vapores, pueden producir la irritación de las membranas mucosas y los ojos, por otra parte no se ha encontrado evidencia de que puedan ser cancerígenos (HSDB, 2006).

En cuanto a efectos en animales, en estudios realizados en ratas se ha visto que los metacrilatos son absorbidos en la sangre a través de la piel, los pulmones y el tracto digestivo, la absorción por la piel y las vías respiratorias puede llegar a tener consecuencias letales. Saillenfait *et al.* (1999) reportaron que el etil y butil metacrilato provocaron una pérdida de peso en fetos de rata así como una disminución en el apetito de las hembras a concentraciones de 1200 y 600 mg·L⁻¹, respectivamente. En estudios llevados a cabo en organismos acuáticos se observó que el metil metacrilato presentó una toxicidad baja, por otro lado en un estudio más detallado realizado en *Scenedesmus quadricauda* se encontró que a una concentración de 37 mg·L⁻¹ durante 8 días de exposición, existe una inhibición en la multiplicación celular. En *Daphnia magna* el compuesto se fijó a 720 mg·L⁻¹. En *Lepomis macrochirus* juveniles y en la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) se reportó que la CL₅₀ se encontró a una concentración de 191 y 79 mg·L⁻¹ de compuesto en el medio respectivamente, durante un periodo de 96 horas (CICAD 4, 1998). La DL₅₀ calculada vía oral en ratas para el metil, etil y butil metacrilato fue de 9.4, 14.8 y 22.6 g·kg⁻¹ de peso corporal respectivamente, de donde se infiere que la toxicidad disminuye conforme la cadena lineal de carbonos aumenta (HSDB, 2006).

A pesar de que el metil metacrilato tiene un factor de bioconcentración bajo (Tabla 1.3), que lo clasifica entre los compuesto con pocas probabilidades de acumularse en los seres vivos, en pruebas de laboratorio se ha encontrado evidencia de que es capaz de acumularse. Raje *et al.* (1985), expusieron ratas a vapores de metil metacrilato a una concentración de 96.7 mg·L⁻¹ de aire durante varios periodos de tiempo, observaron que la mayor concentración se acumuló en la sangre (11.4 mg·100 mL⁻¹ de sangre), seguida del cerebro (25.24 µg·g⁻¹ de cerebro) y por último en los pulmones (20.6 µg·g⁻¹ de pulmón), comprobando que el metil metacrilato se puede acumular en los tejidos. Por otra parte el butil metacrilato se puede acumular en animales acuáticos, debido a que es una

molécula hidrofóbica (Sijm y Hermes, 2000) provocando que tenga un factor de bioconcentración moderado (HSDB, 2006). La bioacumulación representa un peligro para el organismo, ya que puede producir desde cambios metabólicos hasta la muerte, trayendo consigo problemas ecológicos en el ambiente debido a que en las cadenas tróficas se pueden acumular en un nivel o extenderse a los niveles sucesivos, lo que puede derivar en un rompimiento de la cadena alimenticia o afectar a toda la biota participante (Beek *et al.*, 2000).

Estudios basados en el coeficiente de partición carbono-orgánico/agua (Koc), indicaron que las moléculas del metil y etil metacrilato no se pueden adsorber en los sólidos suspendidos, ni en el sedimento marino, caso contrario al butil metacrilato el cual se adsorbe en ambos materiales (Tabla 1.3).

1.3 Digestión anaerobia

Se ha reportado por digestión anaerobia la degradación de moléculas orgánicas con diferente estructura (Speece, 1996). En lo que se refiere a los acrilatos se han realizado estudios bajo estas condiciones en donde se han descrito las rutas metabólicas que siguen, así como los intermediarios generados durante su degradación (Shtarkman *et al.*, 1993 y 1995; Castilla *et al.*, 2004).

La digestión anaerobia consiste en una serie de reacciones, que en ausencia de oxígeno, degradan la materia orgánica hasta metano y dióxido de carbono como productos finales. Este es un proceso complejo en donde se generan diferentes reacciones, debido a la interacción de varias especies de microorganismos (Schink, 2002). En anaerobiosis, compuestos inorgánicos como son los sulfatos, nitratos o CO₂ sirven de aceptores de electrones para poder llevar a cabo las reacciones de sulfato

reducción, desnitrificación así como la metanogénesis hidrogenotrófica. La digestión anaerobia ha sido descrita en diferentes etapas: 1) Acidogénesis, 2) Acetogénesis y, 3) Metanogénesis (Sanders *et al.*, 2003) (Figura 1.4).

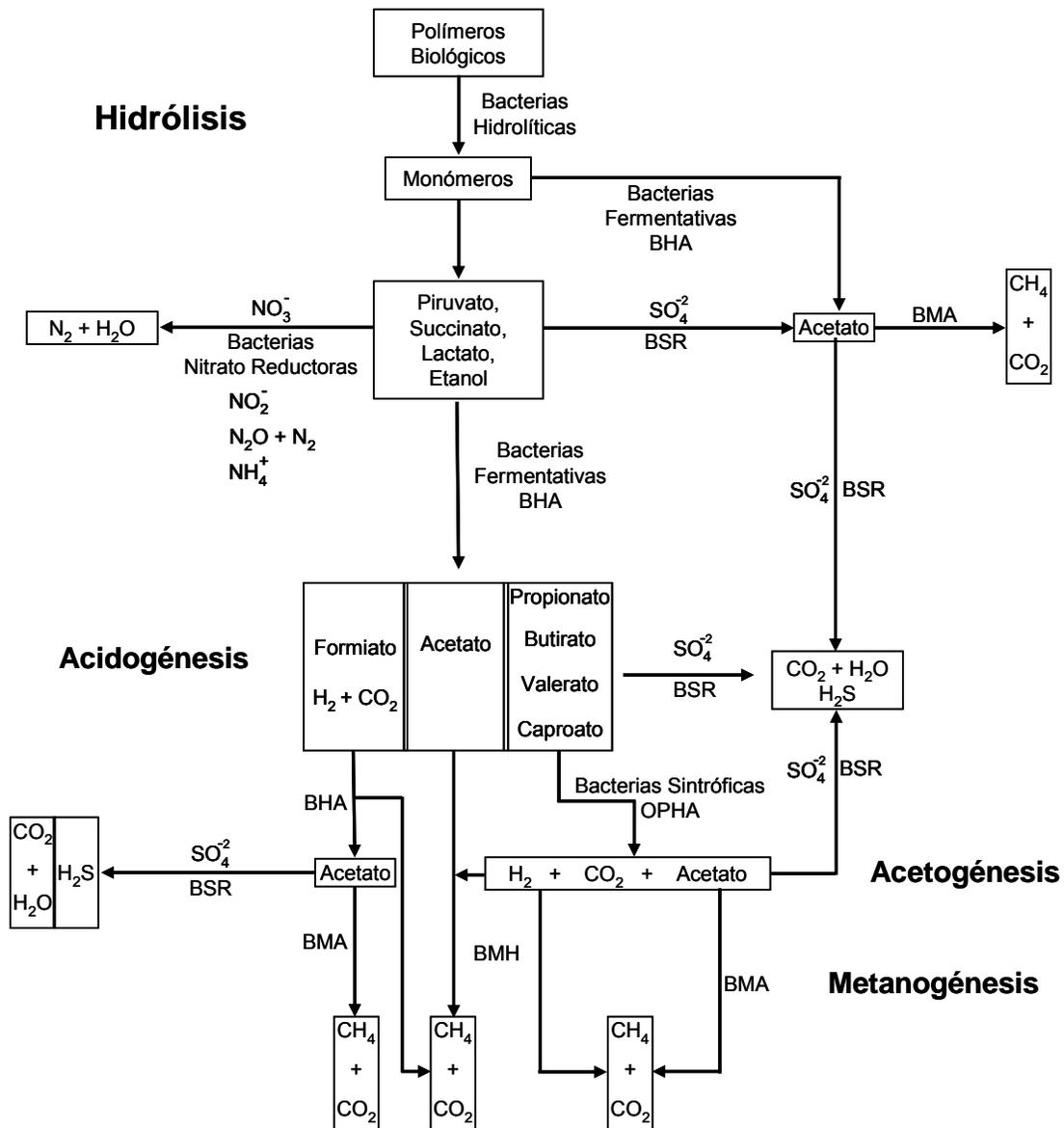


Figura 1.4 Etapas y rutas metabólicas de la digestión anaerobia. BHA) bacterias homoacetogénicas; BSR) bacterias sulfato reductoras; BMA) bacterias metanogénicas acetoclastas; OHPA) bacterias sintróficas acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno; BMH) bacterias metanogénicas hidrogenotrofas.

1.3.1 Acidogénesis: hidrólisis y fermentación

Esta etapa consiste en la hidrólisis de polímeros o moléculas de alto peso molecular (proteínas, carbohidratos, lípidos, etc.) (Figura 1.4) a compuestos más simples o monómeros, por medio de enzimas extracelulares como las celulasas, xilanasas, proteasas entre otras, las cuales son excretadas por bacterias hidrolíticas.

Las proteínas son degradadas a péptidos, mientras que de los polisacáridos producen azúcares de 5 y 6 carbonos, los cuales pueden ser fermentados por una amplia variedad de microorganismos y a través de diferentes vías metabólicas. Generalmente azúcares de 6 carbonos son degradados por la vía de la glucólisis Entner-Doudoroff a piruvato, mientras que los de 5 carbonos son convertidos a piruvato por una vía combinada de la pentosa y la ruta metabólica de la glucólisis. La conversión de azúcares a piruvato es un proceso oxidativo, el cual resulta en la formación de NADH intracelular (Sanders *et al.*, 2003).

Los lípidos son degradados a glicerol y ácidos grasos de cadena larga y estos últimos son transformados a ácidos grasos volátiles (AGV) por la vía de la β -oxidación. El ADN y ARN son degradados a azúcares, purinas y pirimidinas (McInerney, 1988). En esta fase intervienen bacterias proteolíticas, lipolíticas y celulolíticas (Tabla 1.4), las cuales son anaerobias facultativas, crecen en un intervalo de pH entre 5.8-9.0 y a temperaturas que oscilan entre 35 a 60°C (Monroy, 1998).

A este nivel existe la fermentación de los intermediarios provenientes la hidrólisis, por las bacterias fermentativas, conocida como acidogénesis. La fermentación de los alcoholes es similar a la del glicerol y puede formar varios intermediarios de la glucólisis (Sanders *et al.*, 2003). Los productos mas importantes en esta etapa son el CO₂, H₂ y los AGV (fórmico, acético, propiónico, butírico, láctico, valérico, etc.).

Tabla 1.4 Bacterias hidrolíticas que intervienen en la digestión anaerobia (Monroy, 1998).

Microorganismo	Sustrato
<i>Bacteroides succinogenes</i>	
<i>Ruminococcus albus</i>	Celulosa
<i>Acetivibrio cellobioparum</i>	
<i>Bacteroides ruminicola</i>	Hemicelulosa
<i>Butyrovibrio fibrisolvens</i>	
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	Lípidos
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	
<i>Bacillus</i> ssp	Proteínas
<i>Clostridium</i> ssp	
<i>Lactobacillus</i> ssp	Almidón
<i>Pseudomonas</i> ssp	
<i>Clostridium butyricum</i>	

En estudios de ecología microbiana realizados en lodos granulares, se ha observado que este tipo de bacterias se encuentran en la superficie del gránulo y su número es menor en comparación a las bacterias acetogénicas y metanogénicas (McLeod *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 1992) (Figura 1.5). La hidrólisis es el inicio para la degradación de moléculas complejas que se encuentran en los efluentes de la industria química y petroquímica, las cuales son recalcitrantes y tóxicas para los microorganismos. La acidogénesis y la acetogénesis resultan de gran importancia para el tratamiento de aguas residuales, ya que en ellas se producen los sustratos específicos para la metanogénesis.

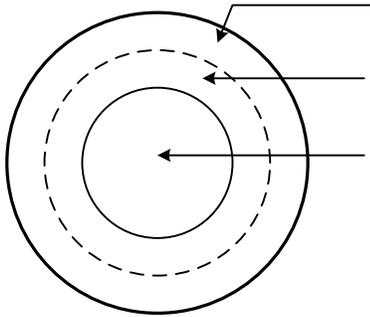


Figura 1.5 Modelo de distribución microbiana en gránulos anaerobios propuesto por McLeod *et al.* (1990).

1.3.2 Acetogénesis.

En esta etapa los productos de la acidogénesis (AGV) son transformados a acetato, hidrógeno y bióxido de carbono, por las bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno, también conocidas como OHPA por sus siglas en inglés (*obligate hydrogen producing acetogens*) (Tabla 1.5). Otra reacción que se presenta a este nivel es la llevada a cabo por las bacterias homoacetogénicas quienes son capaces de producir acetato a partir de dióxido de carbono e hidrógeno. Las bacterias sulfato reductoras fermentativas tienen la capacidad de formar acetato a partir de lactato y etanol (Schink, 1994).

Tabla 1.5 Bacterias sintróficas acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno (OHPA).

Bacterias	Sustrato
<i>Syntrophomonas wolfei</i>	Butirato
<i>Syntrophomonas sapovorans</i>	Oleato
<i>Syntrophomonas wolinii</i>	Propionato
<i>Syntrophomonas buswellii</i>	Benzoato
<i>Syntrophus aciditrophicus</i>	Benzoato y AGV

Monroy, 1998.

Es importante que en la acetogénesis, la presión parcial del hidrógeno se mantenga por debajo de 10^{-1} atm para que el equilibrio termodinámico se desplace hacia la liberación de energía ($\Delta G^{\circ} < 0$) y las bacterias OHPA no sean inhibidas (Monroy, 1998). En este sentido las bacterias hidrogenotrófas son consumidoras de H_2 ayudando a mantener la presión parcial por debajo de la inhibitoria, lo que indica que existe una relación sintrófica entre las hidrogenotrófas y las OHPA. Un ejemplo de cómo influye esta relación en las reacciones, es el caso del butírico y propiónico. La reacción del butírico (Tabla 1.6), bajo condiciones estándar presenta un ΔG° mayor a cero, caso contrario a lo que se ha observado en ambientes naturales y en lodos de reactores, en donde presenta un $\Delta G^{\circ} -70 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, debido a la participación de tres bacterias. En el caso del propiónico, se ha encontrado que en estos ambientes presenta un $\Delta G^{\circ} -62 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Schink, 1997).

En esta etapa también se ha reportado que a partir del butírico, la bacteria *Syntrophomonas wolfei* es capaz de formar biopolímeros de polihidroxibutirato por la ruta metabólica de la β -oxidación (McInerney *et al.*, 1981), este tema se abordará con mayor detalle en el apartado 1.4 de este Capítulo.

Otra reacción que se lleva a cabo en esta etapa, es la isomerización del isobutírico (Tabla 1.6). Lovley y Klug en 1982 fueron los primeros en reportar esta reacción bajo condiciones anaerobias (Figura 1.9), en estudios posteriores se encontró que esta reacción se pudo llevar a cabo en diferentes lodos, los cuales procedían de plantas de tratamiento de aguas industriales (Angelidaki y Ahring, 1995), así como en reactores de tanque agitado (Pind *et al.*, 2003) y en condiciones de termofilia (Batstone *et al.*, 2003).

Tabla 1.6 Reacciones asociadas a la acetogénesis.

Sustrato	Productos	ΔG° (KJ·mol ⁻¹)*
<u>AGV</u>		
Butírico + 2H ₂ O	2 acetato + H ⁺ + 2H ₂	+48.1**
Propiónico + 3H ₂ O	HCO ₃ ⁻ + acetato + H ⁺ + 3H ₂	+76.1**
<u>Amino Ácidos</u>		
2 Glicina + 4H ₂ O	2 acetato + 2HCO ₃ ⁻ + H ⁺ + NH ₄ ⁺ + H ₂	-51.5**
Alanina + 3H ₂ O	acetato + HCO ₃ ⁻ + H ⁺ + NH ₄ ⁺ + 2H ₂	+7.5**
<u>Alcoholes</u>		
Etanol +H ₂ O	acetato + H ⁺ + 2H ₂	+9.6**
Etilen glicol	acetato + H ⁺ + H ₂	-78.7**
<u>Isomerización</u>		
Iso-butírico	n-butírico	-1.98***

* ΔG° = condiciones estándar considerando el ion H⁺ a pH 7.

(**) Thauer *et al.* (1977).

(***) Wu *et al.* (1996).

El isobutírico se puede formar a partir del butírico, como lo comprobaron Zinder *et al.* (1984) al inhibir la hidrólisis de este, quienes encontraron la formación y acumulación del isobutírico. Por otra parte, la valina proveniente de la hidrólisis de proteínas también se puede transformar en isobutírico por la reacción de Strickland (Batstone *et al.*, 2003).

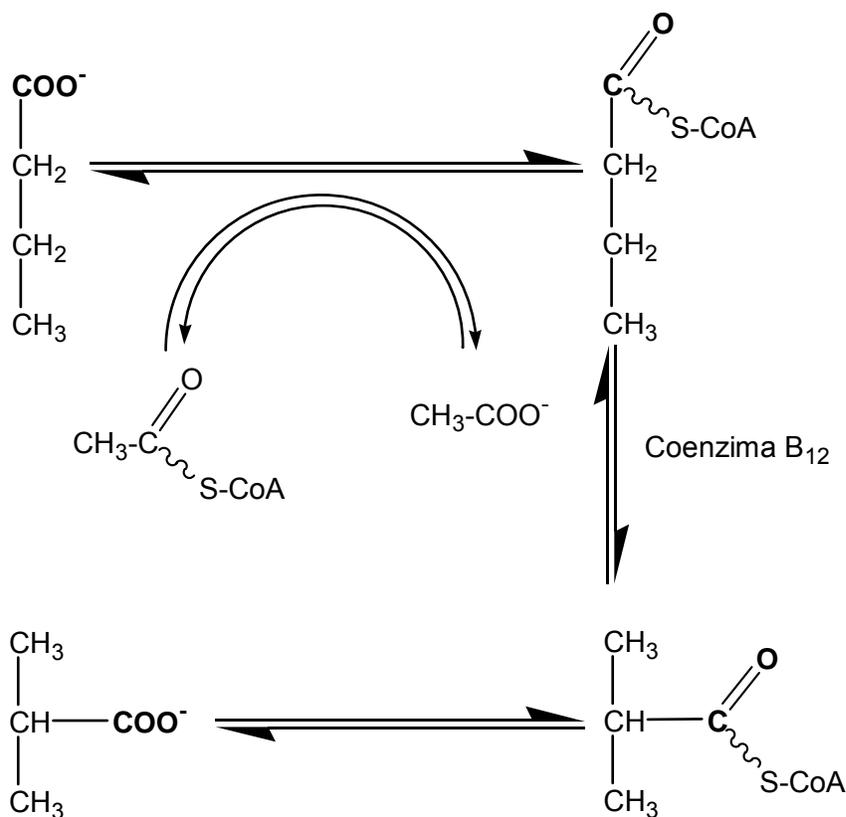


Figura 1.6 Ruta metabólica del isobutírico propuesta por Matthies y Schink (1992).

Estudios cinéticos efectuados por Aguilar *et al.* (1990 y 1995), mostraron que el isobutírico no se puede hidrolizar a acetato directamente por la ruta de la β -oxidación, por lo que la única ruta de degradación es la isomerización a butírico. Esto fue confirmado por Stieb y Schink (1989) y Matthies y Schink (1992) al encontrar que el isobutírico es activado por la coenzima "A" que en conjunto con la enzima isobutiril-CoA mutasa y la coenzima B_{12} sintetizan la reacción, en donde el grupo carboxilo migra al átomo de carbono adyacente (Tholozan *et al.*, 1988)(Figura 1.6).

Esta reacción no puede llevarse a cabo por un solo microorganismo, debido a que el ΔG° es cercano a cero (Tabla 1.6), por este motivo se ha observado que las bacterias que isomerizan el isobutírico realizan el proceso en sintrofía con bacterias acetogénicas (Matthies y Schink, 1992) y metanogénicas (Shelton y Tiedje, 1984; Wu *et al.*, 1994). Esta

condición ha dificultado su aislamiento y propagación debido a que únicamente pueden crecer asociadas a otra bacteria, por tal motivo, en la actualidad se cuenta con pocos reportes de microorganismos identificados (Tabla 1.7).

Tabla 1.7 Bacterias identificadas capaces de isomerizar el ácido isobutírico.

Bacterias	Referencia
<i>Desulfococcus multivorans</i>	Stieb y Schink (1989)
<i>Syntrophothermus lipocalidus</i>	Sekiguchi <i>et al.</i> (2000)
<u>Cepa</u>	
SF-1	Shelton y Tiedje (1984)
WoG13	Matthies y Schink (1992)
IB	Wu <i>et al.</i> (1994)

En trabajos efectuados para evaluar el efecto del hidrógeno en la isomerización del isobutírico, se observó que en cultivos puros la reacción se detenía al alcanzar una presión parcial de 0.4 atm (Wu *et al.*, 1996), mientras que en lodos la inhibición se observó a 1 atm (Lovley y Klug, 1982). Esta diferencia se debió a una mayor presencia de bacterias hidrogenotrofas en el lodo.

1.3.3 Metanogénesis

Las arqueobacterias metanogénicas, a nivel de sustrato consumen un pequeño número de compuestos (acetato, CO₂, H₂, metanol y formiato), por tal motivo se dividen en dos grupos: acetoclastas e hidrogenotrofas (Tabla 1.8), pertenecen al dominio de las Archaea y se encuentran distribuidas en seis géneros (Monroy, 1998). Estas bacterias presentan diversidad de morfologías (cocos, sarcinas, bacilos, espiroquetas, etc), también

presentan diferencias en la estructura de la pared celular, la cual puede estar constituida por subunidades proteicas, de pseudo-mureína o de heteropolisacárido. Son anaerobias estrictas, por lo que requieren potenciales redox menores a -330mV.

Tabla 1.8 Géneros de bacterias que participan en la metanogénesis (Monroy, 1998).

Género	Sustrato
<u>Acetoclastas</u>	
<i>Methanosarcina</i>	acetato, metanol, H ₂
<i>Methanosaeta</i>	acetato
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2 \quad \Delta G^\circ -31\text{KJ}$	
<u>hidrogenotrófas</u>	
<i>Methanobacterium</i>	H ₂ /CO ₂
<i>Methanobrevibacter</i>	
<i>Methanospirillum</i>	
<i>Methanogenium</i>	
$4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \longrightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O} \quad \Delta G^\circ -131 \text{ KJ}$	

El metabolismo de las bacterias metanogénicas es particular ya que poseen coenzimas y cofactores que sólo se encuentran en este tipo de bacterias, como son la coenzima M, la Metil-coenzima M, y el cofactor F₄₂₀ (Thauer, 1998). Las coenzimas catalizan la última etapa de la metanogénesis, mientras que el cofactor es un importante transportador de electrones en la vía metabólica del metano. Tiene la característica de emitir un color azul-verde, cuando es observado en fluorescencia a 420 nm.

Otra característica que muestran a nivel del metabolismo, es la formación del ATP, el cual obtienen de la reducción de las enzimas y no de la fosforilación de los sustratos (Figura 1.7) debido a que generan gradientes de iones a través de la membrana ($\Delta\mu_{\text{Na}^+}, \Delta\mu_{\text{H}^+}$) por la producción de metano (Zeikus, 1977).

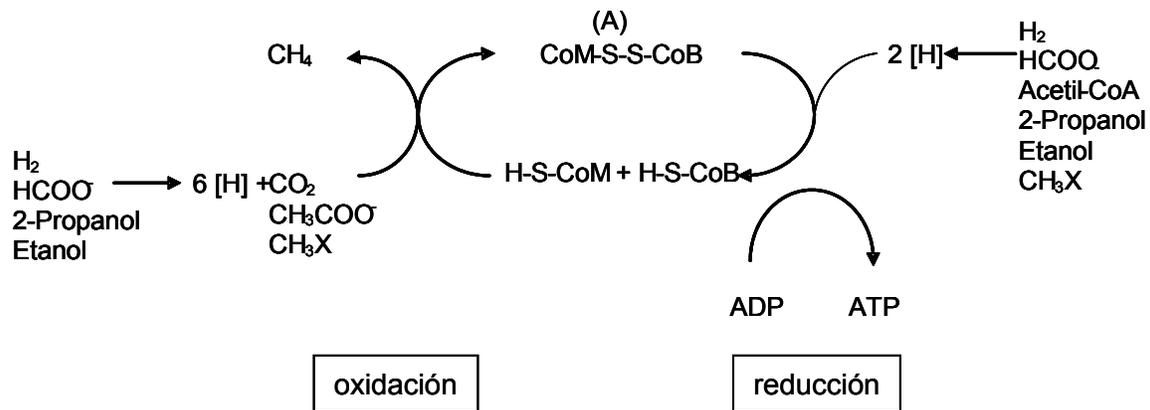


Figura 1.7 Producción de ATP en arqueobacterias metanogénicas, la reducción del heterodisulfuro (A) a coenzima M (CoM) y coenzima B (CoB) está acoplada al transporte de electrones lo que genera la fosforilación del ADP (Tahuer, 1998).

En la naturaleza, las arqueobacterias metanogénicas se presentan en una amplia variedad de ambientes como son: sedimentos de lagos, pantanos, lagunas costeras, el rumen y el tracto digestivo de animales. Otros ambientes en donde se pueden encontrar estos microorganismos son los sistemas de tratamiento de aguas residuales. En lodos granulares se ha reportado que las bacterias metanogénicas se encuentran en mayor cantidad en el centro del gránulo (McLeod *et al.* 1990) (Figura 1.8) lo que ha llevado a postular que estas bacterias tienen un papel importante en la estabilidad del mismo, debido a las proteínas extracelulares que secretan, lo que favorece la adhesión de bacterias (Wu *et al.*, 1992).

1.4 Polihidroxialcanoatos (PHA)

Los PHA son biopolímeros formados a partir de monómeros de 3-hidroxialcanoato (Figura 1.8), los cuales son sintetizados y almacenados intracelularmente por una amplia variedad de bacterias como fuente de carbono y energía. El polihidroxibutirato (PHB) pertenece a esta familia de biopolímeros, siendo el más estudiado debido a las propiedades físico-químicas que presenta (Lee, 1996). En la actualidad se conocen alrededor de 300 bacterias que sintetizan PHA. En condiciones anaerobias se han reportado las bacterias *Syntrophomonas wolfei* (McInerney *et al.*, 1981), *Rhizobium ssp*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Clostridium kluyveri* (Madison y Huisman, 1999) y *Lampropedia ssp* (Mino *et al.*, 1998). Se ha encontrado que los PHA se producen en las bacterias bajo relaciones C/N altas con limitaciones en el medio de nitrógeno, fosfato, magnesio, sulfato y oxígeno (Sudesh *et al.*, 2000).

Los monómeros que conforman a los PHA en los microorganismos tienen la configuración D(-) y poseen pesos moleculares de 2×10^5 a 3×10^6 daltons, este depende del microorganismo y de las condiciones de crecimiento. Desde su descubrimiento en el año de 1926, se han identificado 125 monómeros precursores de PHA (Sudesh *et al.*, 2000), los cuales se dividen en dos grupos dependiendo de los carbonos que tengan: cadena corta (3-5 carbonos) y cadena media (6-14 carbonos) (Lee, 1996).

También se ha comprobado que un PHA puede ser sintetizado a partir de diferentes fuentes de carbono, como es el caso del PHB, el cual se puede producir a partir de carbohidratos y moléculas orgánicas de 1 a 4 carbonos (Yamane, 1992).

Los PHA presentan características mecánicas similares a los polímeros derivados del petróleo, por tal motivo tienen un amplio campo de aplicaciones (insecticidas, empaques, utensilios, etc), además por ser biodegradables se utilizan ampliamente en medicina.

Estas características los convierten en una opción para sustituir a los polímeros derivados del petróleo que no son degradables por medios biológicos (Lee, 1996).

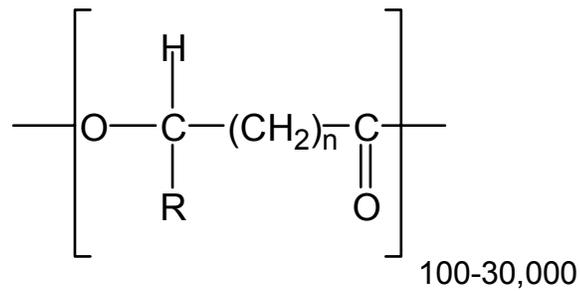


Figura 1.8 Estructura general de los PHA (Lee, 1996).

- n= 1 R= hidrógeno Polilactido
- R= metil Polimetil-lactido
- R= etil Polietil-lactido
- R= propil Polipropil-lactido
- R= pentil Polipentil-lactido
- R= nonil Polinonil-lactido

2. Justificación

Anteriormente se ha reportado la degradación anaerobia de manera individual de los metacrilatos (Shtarkman *et al.*, 1995 y 1993; Jung *et al.*, 1993). No obstante en efluentes industriales estos compuestos se encuentran mezclados ya que provienen del lavado de equipos y de contenedores. Actualmente a estos efluentes se les somete a tratamientos físico-químicos generando lodos químicos no biodegradables y considerados como residuos peligrosos, los cuales se incineran o se confinan lo que es muy costoso. Además de generar residuos de menor peso molecular, como es el caso de la incineración, estos procesos promueven que el problema se traslade de un lugar a otro. Estos compuestos pueden representar un riesgo para la salud ya que son tóxicos para el humano, organismos y por ende a los ecosistemas. Por esta razón, los metacrilatos están clasificados como sustancias peligrosas por la Norma Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005 y la EPA.

La importancia del tratamiento de los efluentes de las industrias que contengan estos compuestos o el tratamiento de aguas residuales, es reducir la concentración de compuestos orgánicos, para evitar o disminuir su efecto nocivo al entrar en contacto con el ambiente. Al presente existen varios tipos de tratamientos de aguas residuales divididos en tratamientos físico-químicos y biológicos.

En los últimos años, se ha empleado el tratamiento biológico de efluentes bajo condiciones anaerobias (Kleerebezem y Macarie, 2003), en donde se busca que los compuestos orgánicos sean utilizados como fuente de carbono y energía por las bacterias presentes en los sistemas de tratamiento, para ser hidrolizados hasta metano y bióxido de carbono. Entre las ventajas del tratamiento anaerobio se tiene: un bajo consumo de

energía ya que no requiere de aireación y un balance positivo de energía debido a la recuperación del CH₄.

La digestión anaerobia, se ha propuesto como una alternativa biotecnológica atractiva para tratar compuestos orgánicos complejos, debido a la asociación sintrófica de grupos microbianos especializados, capaces de hidrolizar moléculas con estructuras químicas complejas a compuestos más sencillos precursores de metano y bióxido de carbono.

A la fecha hay pocos estudios sobre la degradación de metacrilatos y sus intermediarios, se ha estudiado únicamente la degradación de metil metacrilato, y no se tienen reportes sobre la toxicidad de estos compuestos en consorcios microbianos anaerobios. Por lo que en el presente trabajo se probará y estudiará la degradación del ácido metacrílico en lote con un lodo anaerobio para determinar su tiempo de hidrólisis, igualmente se evaluará la hidrólisis de una mezcla de metacrilatos y los posibles intermediarios generados y por último, una mezcla de alcoholes se adicionará al ácido metacrílico para evaluar el efecto de los primeros sobre la hidrólisis de este último.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Estudiar la degradación anaerobia del ácido metacrílico y algunos de sus ésteres en sistemas en lote.

3.2 Objetivos Particulares

- Determinar el perfil de degradación del ácido metacrílico y del metil, etil y butil metacrilato e identificar los intermediarios formados.
- Evaluar el efecto de la adición de H_2 sobre la degradación del ácido metacrílico.
- Evaluar el efecto de la adición del metanol, etanol y butanol sobre la degradación del ácido metacrílico.
- Determinar los niveles de toxicidad del ácido metacrílico y de sus metil, etil y butil ésteres sobre la actividad metanogénica acetoclástica.

4. Materiales y Métodos

En el presente Capítulo se detallan los materiales y métodos utilizados. En la figura 4.1 se muestra la estrategia experimental que se siguió, la cual se compuso de 4 etapas: 1) activación del lodo, 2) evaluación de la actividad metanogénica específica (AME) del lodo, 3) evaluación de la cinética de biodegradación de los compuestos seleccionados en 4 experimento diferentes y 4) determinación de concentraciones de toxicidad. Las etapas 1 y 2 se describen en los apartados 4.1.1 y 4.2 respectivamente. Las etapas 3 y 4 se refieren en el Capítulo 5.

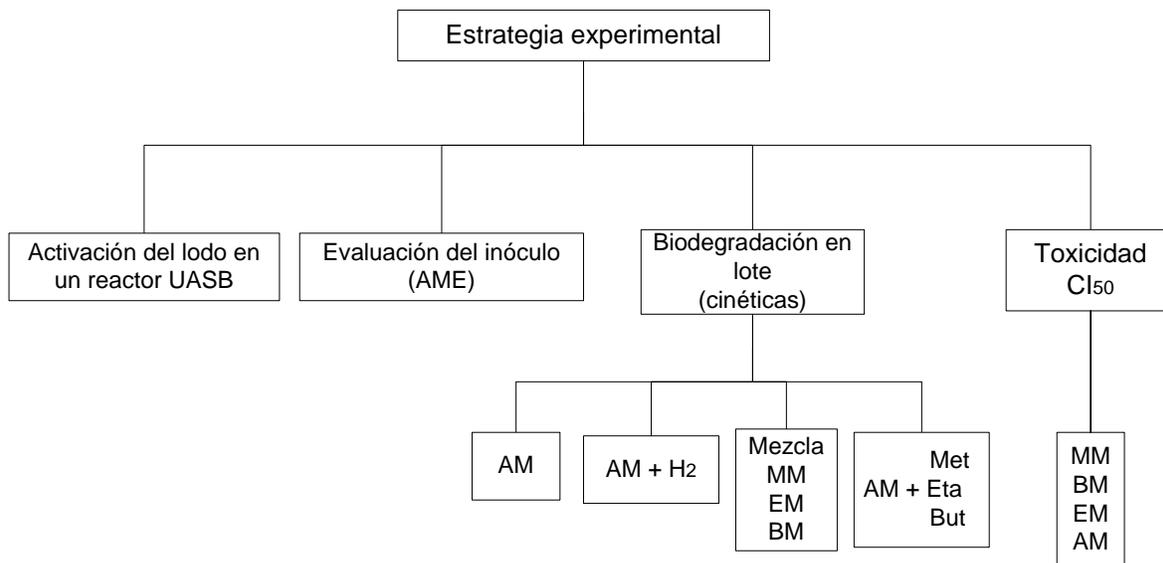


Figura 4.1 Esquema del trabajo experimental seguido durante esta investigación.

4.1 Inóculo

En esta investigación se utilizaron dos lotes de lodo granular procedentes de una planta de tratamiento de aguas residuales de una productora de malta para cervecería. El primer lote presentó una concentración promedio de sólidos suspendidos volátiles (SSV) de $33.21 \text{ gSSV}\cdot\text{L}^{-1}$ y fue utilizado para las cinéticas de degradación (Apartado 4.4.1). El segundo lote presentó una concentración de $51.06 \text{ gSSV}\cdot\text{L}^{-1}$ y fue empleado para

experimentos de toxicidad (Apartado 4.4.3). La concentración de SSV se calculó como se describe en el apartado 4.6 de este Capítulo.

4.1.1 Activación del lodo

Antes de los experimentos, el lodo fue activado por un periodo de 15 días en un reactor UASB de 2.5 L, utilizando medio mineral (Balch *et al.*, 1979; descrito en el Anexo 1.1) y una mezcla de glucosa y acetato de sodio como fuente de carbono en una relación 1:1 como DQO, una carga orgánica volumétrica (Bv) de $1\text{gDQO}(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$ y un tiempo de residencia hidráulica (TRH) de 2 días.

4.2 Actividad metanogénica específica (AME)

La actividad metanogénica específica se define como la relación de la producción de metano expresado como $\text{gDQO}\cdot\text{CH}_4$, con respecto al contenido de SSV y al tiempo. Es una manera indirecta de evaluar el desempeño de bacterias que intervienen en la digestión anaerobia (Schmit y Arhing, 1996; Jawed y Tare, 1999). La AME depende de factores como son la cantidad de bacterias viables, la afinidad de las bacterias por el sustrato, el potencial redox y la fuente de energía (Schmidt y Arhing, 1996).

Después de activar el lodo en el reactor, se evaluó la AME por triplicado en botellas serológicas de 60 mL como sigue: a cada una se le agregaron 5 mL de lodo, 2 mL de solución de glucosa a una concentración de $15\text{gDQO}\cdot\text{L}^{-1}$ y 23 mL de medio mineral (Balch *et al.*, 1979), para obtener un volumen de 30 mL a una concentración de $1\text{gDQO}\cdot\text{L}^{-1}$. Se sellaron las botellas con tapones de caucho forrados con cinta de teflón y se intercambiaron la fase gaseosa con una mezcla de gases $\text{N}_2:\text{CO}_2$ (80%:20%) durante 2 minutos, para obtener condiciones de anaerobiosis. El metano producido se midió por

desplazamiento de una solución de NaOH al 3% (Figura 4.2) cada 2 horas, la temperatura de incubación fue de 35°C.

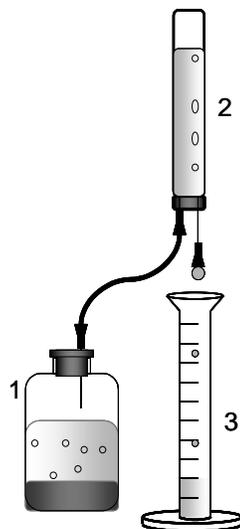


Figura 4.2 Cuantificación de metano por desplazamiento de solución de NaOH al 3%. 1) botella serológica, 2) tubo con solución de NaOH y 3) probeta.

El volumen de metano producido se ajustó a condiciones de temperatura y presión estándar. Además se calculó la equivalencia de metano como DQO y en moles.

$$V_{\text{CH}_4\text{STP}}(\text{L}) = V_p(\text{L}) \times \frac{273^\circ \text{K}}{308^\circ \text{K}} \times \frac{585 \text{ mmHg}}{760 \text{ mmHg}} \quad (4.1)$$

$$\text{gDQO} - \text{CH}_4 = V_{\text{CH}_4\text{STP}}(\text{L}) \times \frac{\text{DQO}(\text{g})}{0.35 (\text{L}_{\text{CH}_4})} \quad (4.2)$$

$$n_{\text{CH}_4} = \frac{0.7697(\text{atm}) \times V_p(\text{L})}{0.082 \left(\frac{\text{L} \cdot \text{atm}}{\text{mol} \cdot ^\circ\text{K}} \right) \times 308^\circ\text{K}} \quad (4.3)$$

Donde:

V_{CH_4} = Volumen de metano a condiciones de temperatura y presión estándar

V_p = Volumen parcial de metano producido

La AME se calculó utilizando la ecuación 4.4, obteniendo la pendiente del metano producido expresado como DQO respecto al tiempo y se calculó en el intervalo de mayor velocidad de producción de metano (Anexo 2).

$$AME_{CH_4} = \frac{m(\text{gDQO-CH}_4 \cdot [\text{L} \cdot \text{d}]^{-1})}{X(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})} \quad (4.4)$$

En donde:

m = pendiente = $\text{gDQO-CH}_4 \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$

X = biomasa (SSV)

El lodo presentó una AME de $0.46 \text{ gDQO-CH}_4 (\text{gSSV} \cdot \text{d})^{-1}$ (Anexo 2), lo que concordó con lo reportado por Schmidt y Arhing (1996) para este tipo de lodo que es de $0.5 \text{ gDQO-CH}_4 (\text{gSSV} \cdot \text{d})^{-1}$.

4.3 Cálculo de la DQO teórica

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

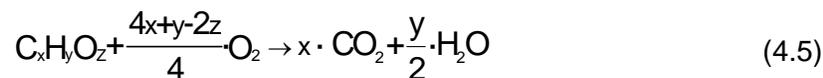


Tabla 4.1 Valor de la DQO teórica para cada compuesto.

Sustrato	DQO teórica
Glucosa	1.066 gDQO(gC ₆ H ₁₂ O ₆) ⁻¹
Acetato	1.066 gDQO(gC ₂ H ₄ O ₂) ⁻¹
Metil metacrilato	1.91 gDQO(gC ₅ H ₈ O ₂) ⁻¹
Etil metacrilato	2.1 gDQO(gC ₆ H ₁₀ O ₂) ⁻¹
Butil metacrilato	2.36 gDQO(gC ₈ H ₁₄ O ₂) ⁻¹
Ácido metacrílico	1.67 gDQO(gC ₄ H ₆ O ₂) ⁻¹
Metanol	1.5 gDQO(gCH ₄ O) ⁻¹
Etanol	2.08 gDQO(gC ₂ H ₆ O) ⁻¹
Butanol	2.59 gDQO(gC ₄ H ₁₀ O) ⁻¹

4.4 Cinéticas

Las cinéticas se realizaron en botellas serológicas de 60 mL. Se prepararon por duplicado para la cinética de degradación de compuestos y por triplicado para las cinéticas de toxicidad. Las botellas se sellaron utilizando arillos de aluminio y tapones de caucho forrados con cinta teflón, y el cambio de atmósfera se hizo utilizando una mezcla N₂:CO₂ (80%:20%) durante 2 minutos para así desplazar el aire del espacio gaseoso. La temperatura de incubación fue de 35°C.

4.4.1 Cinéticas de degradación de compuestos

A las botellas serológicas se les adicionaron 5 mL de lodo y 21 mL de medio mineral (Balch *et al.*, 1979) a pH 7, ajustado con 2g de bicarbonato de sodio por litro como amortiguador. Por último se les agregaron 4 mL de una solución concentrada de los

compuestos a estudiar, para tener un volumen de trabajo de 30 mL. Se adicionó una cantidad de ácido metacrílico para obtener una concentración de $11.61 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Las botellas se mantuvieron en agitación constante a 125 rpm en una incubadora a 34°C . La relación másica para cada una de las cinéticas se indica en la tabla 4.2. Las botellas se prepararon por duplicado para cada tiempo de muestreo y se desecharon después de tomar la muestra.

Tabla 4.2 Relación másica para las cinéticas.

Cinética	Relación másica ($\text{gDQO}\cdot\text{gSSV}^{-1}$)
Ácido metacrílico	
Ácido metacrílico con H_2CO_2	0.05
Mezcla de metacrilatos	
Ácido metacrílico y alcoholes	0.089

4.4.2 Velocidad específica de consumo de sustrato

La velocidad específica de consumo de sustrato o hidrólisis del sustrato (V_{ec}) se calculó de la pendiente obtenida de la concentración de sustrato con respecto al tiempo, entre la concentración de biomasa. La pendiente se calculó en el intervalo de mayor velocidad de consumo (ec. 4.6)

$$V_{ec} = \frac{m(\text{gSus}[\text{L}\cdot\text{d}]^{-1})}{X(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})} \quad (4.6)$$

Donde:

Sus = Sustrato (compuesto o DQO)

m = pendiente = $\text{gSus}\cdot(\text{L}\cdot\text{d}^{-1})$

X = biomasa (SSV)

4.4.3 Cinéticas de toxicidad para determinar concentraciones inhibitorias (CI_{50})

La CI_{50} se calculó para el ácido metacrílico, butil, etil y metil metacrilato, y se define como la concentración de un tóxico necesaria para disminuir en un 50% la actividad metanogénica específica. Según Speece (1996) la toxicidad se define como un efecto adverso en el metabolismo microbiano y que no necesariamente sea letal.

Cada cinética se preparó como se describe en el apartado 4.4 de este Capítulo, con las condiciones que se describen a continuación. Para cada botella se pesaron y agregaron 0.817 g de lodo húmedo anaerobio con una concentración de $51.06 \text{ gSSV}\cdot\text{L}^{-1}$ para obtener una concentración de $2 \text{ gSSV}\cdot\text{L}^{-1}$ y se adicionaron 40 mL de medio mineral (Visser, 1995, Anexo 1.2). Inicialmente se alimentó el lodo anaerobio con una solución de acetato a una concentración de $2.5 \text{ gDQO}\cdot\text{L}^{-1}$ y después de 24 horas se agregaron los compuestos tóxicos en diferentes concentraciones (Tabla 4.3) y se dejaron en exposición por un periodo de 72 horas con el fin de que los compuestos estuvieran en contacto con la biomasa. Pasado este tiempo, se realimentaron con una solución de acetato a $1 \text{ gDQO}\cdot\text{L}^{-1}$ y se determinó el metano producido para obtener la AME como se mencionó en el apartado 4.2 de este Capítulo. Para cada prueba se prepararon controles sin tóxico y los resultados de toxicidad están expresados como AME relativa a los controles (100% de la actividad).

Tabla 4.3 Concentraciones utilizadas para determinar la toxicidad de cada compuesto.

	Concentraciones ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)							
BM	0.31	0.62	1.21	1.77	2.3	2.82		
EM	0.88	1.75	5.26	7.01	8.77			
MM	10	16.99	23.99	30.98	37.98	44.98	51.97	65.97
AM	23.23	34.85	46.46	58.08	69.69	81.31		

4.4.4 Preparación de muestras para análisis en cromatografía de gases

Se tomó un volumen de 1.5 mL de muestra, el cual se colocó en un vial de plástico, se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min. Se tomaron 950 μ L del sobrenadante y se depositaron en un vial limpio con 50 μ L de HCl al 50%. La muestra así preparada se analizó por cromatografía de gases. La composición del biogás se determinó como se describe en el apartado 4.5.2 de este Capítulo.

4.4.5 Balances de carbono

Los balances de carbono (C) se hicieron calculando la concentración en milimoles de este para cada compuesto: sustrato, intermediario o producto, utilizando la siguiente relación:

$$\frac{\text{mmol } X}{L} \times \frac{\text{mmol C-X}}{\text{mmol } X} = \frac{\text{mmol C-X}}{L} \quad (4.7)$$

Donde :

X = CO₂, CH₄, AM, AI, Ace, MM, EM ó BM.

4.5 Técnicas analíticas

4.5.1 Cuantificación de sustratos e intermediarios

Los intermediarios y sustratos se determinaron y cuantificaron con un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 serie II, de inyección automática y las condiciones de análisis fueron las siguientes:

Detector de ionización de flama (FID)

Temperatura del detector: 180°C

Temperatura del inyector: 150°C
Rampa de la columna: de 40 – 170 °C
Columna: AT-1000, longitud 10 m, Ø 0.53 mm
Gas acarreador: Nitrógeno
Flujo: 6.6 mL/min
Tiempo de corrida: 20 minutos
Volumen de inyección: 0.5 µL

Se creó una rampa de temperatura, con el fin de poder resolver todos los sustratos e intermediarios, iniciando en 40°C con un incremento de 5°C/min, hasta alcanzar 80°C. Una vez a esta temperatura, se elevó hasta 170°C a 15°C/min, permaneciendo por 9 minutos a esta temperatura, con el fin de limpiar la columna de posibles residuos.

Las curvas de calibración se corrieron por triplicado y se calculó el promedio, la desviación estándar, así como los coeficientes de regresión (Anexo 4.1).

4.5.2 Cuantificación de metano y bióxido de carbono

El metano y el bióxido de carbono se cuantificaron por cromatografía de gases durante las cinéticas de degradación de compuestos utilizando un cromatógrafo Gow-Mac, con una columna de acero empacada. Con las siguientes condiciones de análisis:

Detector: TCD (Thermal conductivity detector)
Temperatura de la columna: 140 °C
Temperatura del detector: 190 °C
Temperatura del inyector: 170 °C
Corriente en el detector: 120 mA

Gas acarreador: Helio

Flujo: 25 mL/min

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

Volumen de inyección: 0.1 mL.

Las curvas de calibración se realizaron por triplicado y se calculó el coeficiente de regresión (Anexo 4.2).

4.6 Determinación de sólidos suspendidos volátiles

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

Se lavaron perfectamente los crisoles y se secaron en la estufa a 105 °C hasta obtener un peso constante. A continuación se tomaron 5 mL de lodo y se procedió a colocar los crisoles en estufa a 105 °C durante 1 hora, al enfriarse se registró el peso (sólidos secos). Posteriormente, se colocaron en una mufla a 550°C por 30 minutos. Al enfriarse se registró el peso nuevamente (sólidos fijos). La concentración de cada uno de ellos se determinó de la siguiente manera:

$$\text{Sólidos Totales (g}\cdot\text{L}^{-1}) = \left(\frac{\text{Peso de sólidos secos} - \text{Peso del Crisol}}{\text{Volumen de Muestra (L)}} \right) \quad (4.8)$$

$$\text{Sólidos Fijos (g}\cdot\text{L}^{-1}) = \left(\frac{\text{Peso de sólidos fijos} - \text{Peso del Crisol}}{\text{Volumen de Muestra (L)}} \right) \quad (4.9)$$

$$\text{Sólidos Volátiles (g}\cdot\text{L}^{-1}) = (\text{Sólidos totales} - \text{Sólidos Fijos}) \quad (4.10)$$

4.7 Carbono orgánico e inorgánico

La cuantificación de carbono total e inorgánico se hizo en un analizador Shimadzu TOC-500A.

La muestra se preparó tomando 5 mL de fase líquida de la botella serológica y se distribuyó en viales de plástico de 1.5 mL para ser centrifugados a 12000 rpm durante 15 min. Se recuperó la fase líquida, la cual se filtró utilizando filtros de nitrocelulosa (Millipore, poro 0.22 μ m, \varnothing 13mm). El equipo detecta primero el carbono total y posteriormente el carbono inorgánico. La concentración mínima detectable es de 1mg·L⁻¹. El carbono orgánico total (COT) se calculó de acuerdo a la ecuación 4.10.

$$\text{COT (mg}\cdot\text{L}^{-1}) = [\text{Carbono Total (mg}\cdot\text{L}^{-1}) - \text{Carbono inorgánico (mg}\cdot\text{L}^{-1})] \quad (4.11)$$

4.8 pH

El pH se midió con un potenciómetro marca Corning, modelo pH/ion 455.

4.9 Presión parcial de hidrógeno

La presión parcial de hidrógeno en la cinética de degradación del apartado 5.2 del Capítulo de Resultados y Discusión se calculó utilizando la ley de Henry:

$$p_A = y_A P_T \quad (4.12)$$

En donde:

p_A = Presión parcial de la especie A

y_A = Fracción molar de la especie A en la mezcla de gas

P_T = Presión total del sistema (atm)

Se utilizó una mezcla $H_2:CO_2$ a una relación 80:20 por lo tanto

$$y_{H_2} = \frac{0.8 \text{ mol} \cdot H_2}{\text{mol gas}}$$

La P_T se midió a 17 botellas serológicas con un manómetro marca Alltech modelo QC 199. La P_T fue de 19.44 psi \pm 4.4

La p_{H_2} del hidrógeno fue de 15.552 psi que equivale a 1.057 atm.

4.10 Tinción de polihidroxitirato (PHB)

Los biopolímeros se tiñeron siguiendo la técnica de Ostle y Holt (1982) con Azul de Nilo. Para realizar la tinción, se maceró el lodo en un crisol para desintegrar los gránulos, posteriormente se centrifugó a 4500 rpm por 5 min, con el fin de separar la biomasa de los sólidos suspendidos para así obtener el sobrenadante. Las muestras se tiñeron y se analizaron en un microscopio marca OLYMPUS modelo BH2-RFCA equipado con una lámpara de fluorescencia OLYMPUS BH2-RFL-T3. Las fotos y observaciones se realizaron con el objetivo de 100X a 460 nm (Figura 4.3).



Figura 4.3 Gránulos de PHB en color naranja teñidos con Azul de Nilo. (microscopía de fluorescencia, 100X).

5. Resultados y Discusión

Las investigaciones sobre la degradación de diversos metacrilatos se han llevado a cabo de manera individual, lo que no ha permitido observar la influencia de los intermediarios que se generan durante la hidrólisis de los compuestos. El estudio de los intermediarios es importante debido a que por un lado estos pueden favorecer o inhibir ciertas reacciones implicadas en la degradación, lo que puede derivar en la formación de sustancias más peligrosas o por el contrario favorecer las reacciones para una completa hidrólisis hasta metano y dióxido de carbono y por otro lado arrojan información sobre la ruta metabólica de degradación y mineralización. El ácido metacrílico es un intermediario que se genera de la hidrólisis de los metacrilatos y se ha observado que tiene un efecto inhibitorio sobre la digestión anaerobia debido a que no es mineralizado completamente hasta metano y dióxido de carbono. Por tal motivo, en este trabajo se realizaron cinéticas de biodegradabilidad de ácido metacrílico en diferentes condiciones y una cinética de una mezcla de metil, etil y butil metacrilato.

La primera cinética se diseñó con el fin de determinar el tiempo de hidrólisis y los intermediarios generados a partir del ácido metacrílico y se encontró que una fracción de carbono fue utilizada para la formación de polihidroxitirato. En la siguiente se evaluó la influencia del H_2 sobre la degradación del ácido metacrílico, se observó que la presencia del H_2 en el medio no mejoró la velocidad de consumo del metacrílico; sin embargo inhibió el consumo del ácido isobutírico. Se llevó a cabo una cinética con la mezcla de metacrilatos, en donde se encontró que la hidrólisis del enlace éster es el primer paso para su degradación, por lo que en una cuarta cinética se probó una mezcla de alcoholes y ácido metacrílico, encontrando que favorecen la saturación del doble enlace del ácido y la formación posterior de isobutírico.

5.1 Cinética de degradación de ácido metacrílico

5.1.1 Ácido metacrílico

En esta cinética se encontró una concentración inicial de $12.99 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($1.119 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y se siguió por un periodo de 45 días. Los resultados se presentan en la Figura 5.1. La temperatura de trabajo fue de 34°C y el pH se mantuvo en 6.76 ± 0.07 . Durante la cinética no se detectaron acetato ni butirato, la velocidad de consumo del ácido metacrílico fue de $0.0153 \text{ gAM}(\text{gSSV}\cdot\text{d})^{-1}$.

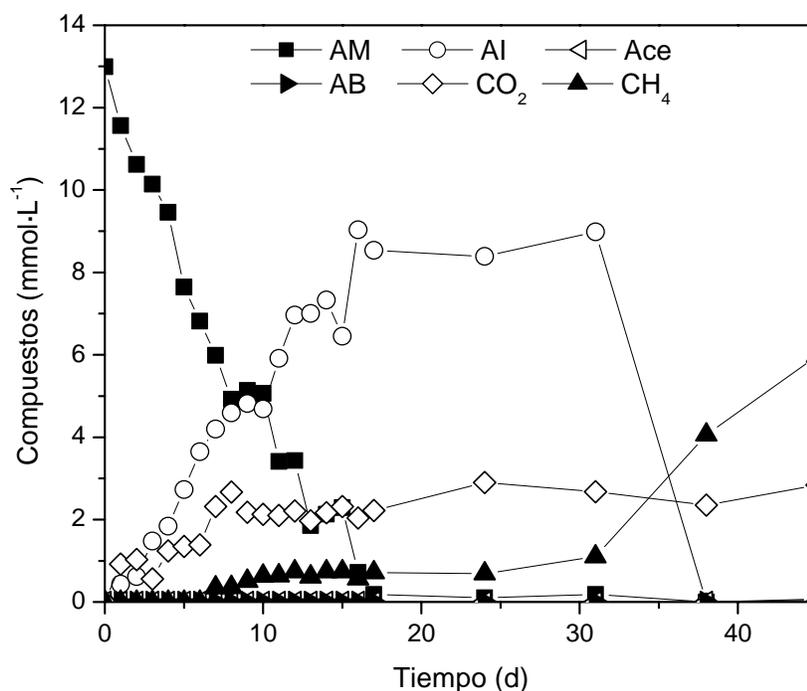


Figura 5.1 Degradación de ácido metacrílico y producción de biogás. AM) ácido metacrílico; AI) ácido isobutírico; Ace) acetato; AB) ácido butírico.

El ácido metacrílico se transformó completamente en ácido isobutírico desde el inicio de la cinética en un lapso de 16 días cuando alcanzó la concentración mas alta ($9.035 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). Permaneció constante por un periodo de 15 días, debido posiblemente a una fase de adaptación del lodo a este compuesto, ya que a partir del día 31 se empezó a consumir, agotándose en el día 38.

Estos datos concuerdan con lo reportado por Shtarkman *et al.* (1993 y 1995), quienes encontraron que el ácido metacrílico es transformado a isobutírico en un periodo de 6 días. Encontraron también que este era consumido en un periodo de 12 días, siendo hidrolizado hasta metano y dióxido de carbono, produciendo ácido butírico y acetato como intermediarios como puede verse en la ruta mostrada de la Figura 5.2.

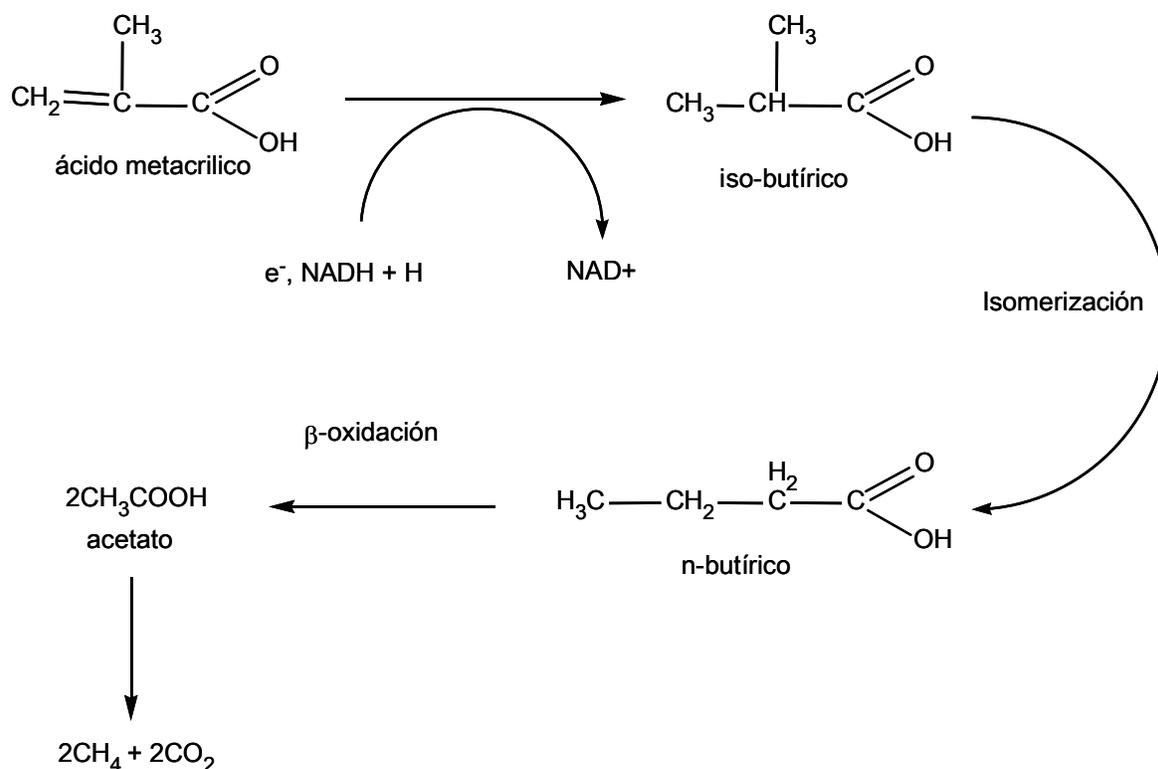


Figura 5.2 Ruta metabólica de la mineralización del ácido metacrílico (Shtarkman *et al.* 1993 y 1995).

Está reportado por Mikoulinskaia *et al.* (1999) y Gross *et al.* (2001) que la transformación del ácido metacrílico en isobutírico puede ser llevada a cabo en presencia de acetato como donador de electrones, por las bacterias *Geobacter sulfurreducens* y *Wolinella succinogenes*. Esta reacción se da por medio de la enzima periplásmica metacrilato reductasa (50 KDa), la cual depende del citocromo “c” (Cit_c) para llevar a cabo dicha reacción (Figura 5.3).

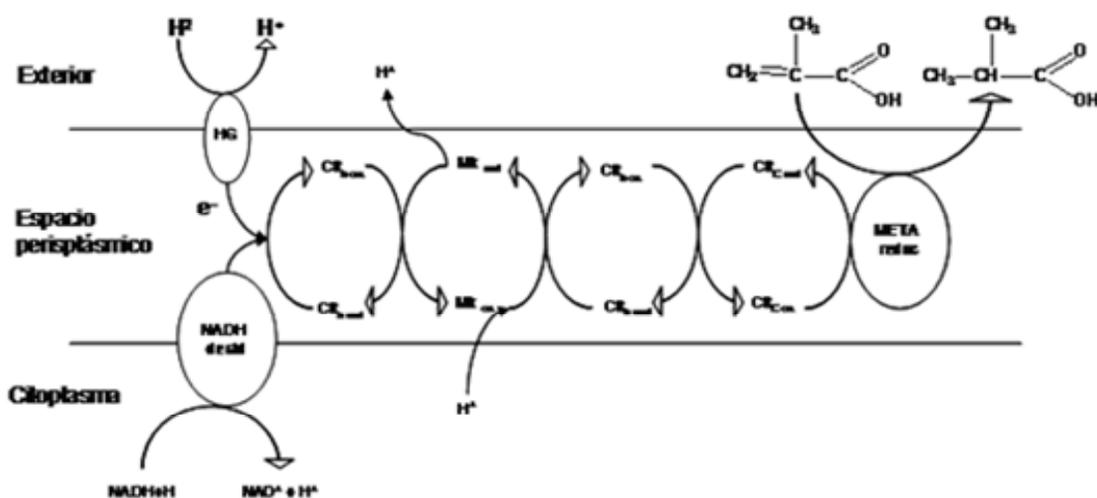


Figura 5.3 Secuencia del transporte de electrones en las bacterias *Geobacter sulfurreducens* y *Wolinella succinogenes*. HG) hidrogenasa; NADH_{deshi}) NADH deshidrogenasa; Cit_b) citocromo “b”; Mk) menaquinona; Cit_c) citocromo “c”; META_{reduc}) metacrilato reductasa.

Al no utilizar una fuente de electrones como el acetato, posiblemente los electrones requeridos para la reducción del ácido metacrílico provinieron de otra fuente, como la presencia de hidrógeno molecular en el medio. Caccavo *et al.* (1994) y Kröger *et al.* (2002) reportaron que las bacterias *Geobacter sulfurreducens* y *Wolinella succinogenes* poseen en su membrana celular enzimas hidrogenasas que son capaces de activar el H₂ (ec. 5.1).



Estos últimos son translocados por la misma hacia el interior de la membrana (Figura 5.3), donde son transportados por diferentes acarreadores, entre los que se destaca la presencia de la menaquinona (la bacteria *Geobacter sulfurreducens* posee la menaquinona-8), que transfiere los electrones al citocromo “b” (Cit_b) y este a su vez al Cit_c para finalmente cedérselos a la enzima metacrilato reductasa (Mikoulinskaia *et al.*, 1999; Gross *et al.*, 2001).

Otra posible fuente de electrones en las bacterias, sería la coenzima NAD^+ (nicotinamida adenín dinucleótido), ya que esta molécula tiene la capacidad de almacenar y transportar electrones (Madigan *et al.*, 2003; Berry, 2002). Los electrones provenientes de la NAD^+ entran a través de la membrana, por medio de la NADH deshidrogenasa (Figura 5.3), la cual se encarga de reducir el $\text{NADH}+\text{H}$. Los electrones son transportados hacia el interior, y siguen la misma ruta antes descrita, hasta llegar a la enzima metacrilato reductasa que es responsable de la saturación del doble enlace del ácido metacrílico para la producción del ácido isobutírico.

5.1.2 Dióxido de carbono y metano

Durante los 8 días iniciales de la cinética, se produjo CO_2 que alcanzó una concentración de $2.67 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 5.1) constante hasta el final del experimento. La mayor producción de metano se dio después del día 31, que es precisamente cuando se empezó a consumir el ácido isobutírico. Esto se pudo deber a que una fracción de ácido isobutírico se isomerizó a ácido butírico el cual posteriormente fue mineralizado hasta CH_4 . La concentración final de metano fue de $5.97 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 5.1). Después del día 45 tanto la concentración de CH_4 como de CO_2 se mantuvieron constantes.

5.1.3 Balance de carbono y formación de polihidroxitirato (PHB)

El carbono recuperado como CH_4 y CO_2 al final de la cinética, solo representó el 17% del carbono proveniente del ácido metacrílico, por lo que hubo un faltante del 83%. El balance de carbono mostrando este faltante se presenta en la Tabla 5.1.

Anteriormente y de manera similar Shtarkman *et al.* (1995), reportaron solamente una recuperación del 20% de carbono como metano en experimentos llevados a cabo con ácido metacrílico adicionado a un lodo anaerobio no adaptado.

Tabla 5.1 Carbono recuperado a diferentes tiempos de la cinética de degradación de ácido metacrílico ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$).

Tiempo (d)	Fase líquida		Fase gaseosa		Total recuperado (%)
	Ácido Metacrílico	Ácido Isobutírico	CH_4	CO_2	
0	52	0	0	0	100
16	2.26	36.13	0.7	2.2	79.4
31	0	36	1.1	2.66	76.5
45	0	0	5.96	2.83	17.0

El faltante más importante de carbono se encontró después del consumo de isobutírico (día 45) debido a que no se detectó ningún otro compuesto en la fase líquida, y solamente se observó un incremento de $4.87 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ como $\text{C}\text{-CH}_4$ en la fase gas al final de la cinética (Figura 5.1, Tabla 5.1). Una posible explicación para el carbono faltante, es que el ácido metacrílico es tóxico para lodos no adaptados, imponiendo una condición de estrés bajo la cual algunos microorganismos tienen la capacidad de almacenar energía en forma de sustancias intracelulares como los PHB, por lo que se procedió a la realización de tinciones con Azul de Nilo tanto al lodo que había sido expuesto al compuesto y al lodo utilizado como control para la detección de estos biopolímeros.

En las muestras del control no se detectó la presencia de PHB, pero se observó la presencia abundante de PHB en el lodo expuesto al ácido metacrílico (Figura 5.4), lo que sugiere que el carbono faltante fue utilizado para la síntesis de este polímero. No se detectó butírico durante la cinética, posiblemente porque fue consumido rápidamente por el inóculo para la formación de PHB.

McInerney *et al.* (1981) y Amos y McInerney (1991), reportaron la formación de PHB y acetato en la bacteria anaerobia *Syntrophomonas wolfei* cuando utilizaron ácido butírico como sustrato. La presencia de PHB sugiere que el ácido isobutírico fue isomerizado a *n*-butírico antes de ser consumido por las bacterias fermentativas como lo han reportado

Tholozan *et al.*(1988), Aguilar *et al.* (1990), Angelidaki y Ahring (1995), Pind *et al.* (2003) y Yu *et al.* (2004).



Figura 5.4 Gránulos de PHB teñidos con Azul de Nilo al final de la cinética (microscopía de fluorescencia: 460 nm, 100x).

Estos resultados sugieren que la presencia del ácido metacrílico en el medio tuvo un efecto de inducción sobre las bacterias fermentativas y por ende en la ruta metabólica de la β -oxidación (Figura 5.5), favoreciendo la formación de PHB a partir del butírico y no la de acetato como había sido reportado (McInerney *et al.*, 1981; Wofford *et al.*, 1986).

Amos y McInerney, en 1991 describieron la ruta para la formación de PHB en *Syntrophomonas wolfei* (Figura 5.5), y en ésta se puede distinguir que el D(-)3-hidroxi-butiril-CoA es la molécula precursora del PHB, la cual puede ser formada a partir de la crotonil-CoA y la acetoacetil CoA.

En el caso de esta cinética, el ácido metacrílico pudo inhibir a las enzimas 3-enoil-CoA o la fosfotransacetilasa, evitando así la formación de acetato y una mayor producción de metano.

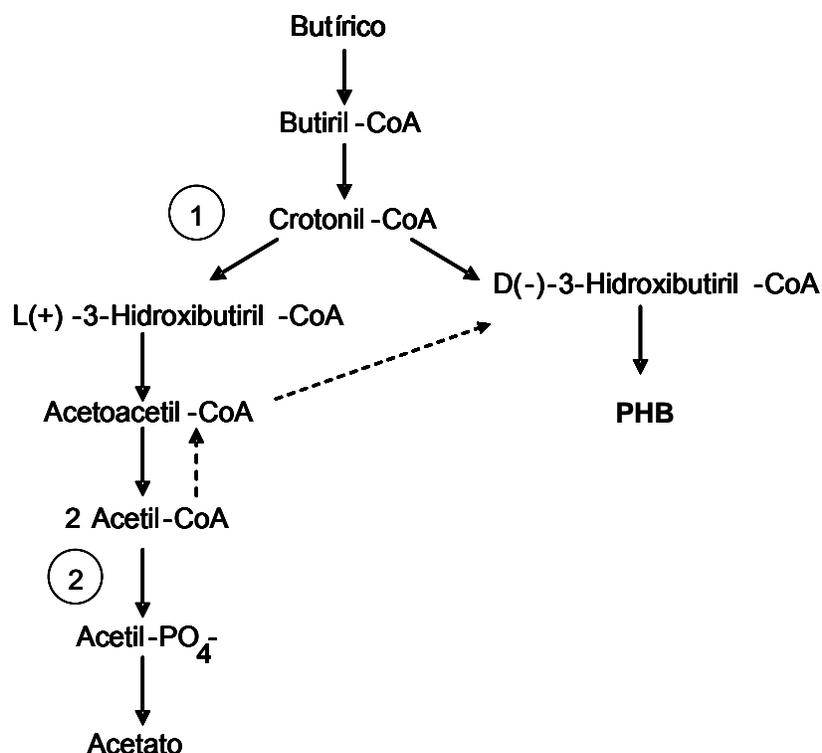


Figura 5.5 Ruta de la degradación del ácido butírico por β -oxidación en *Syntrophomonas wolfei* y de síntesis de PHB. Posibles enzimas inhibidas, (1) 3-enoil-CoA, (2) fosfotransacetilasa (tomado de Amos y McInerney, 1991).

5.2 Cinética de ácido metacrílico con $H_2:CO_2$

5.2.1 Ácido metacrílico

En base a los resultados de la cinética anterior y considerando la necesidad de adicionar una fuente de electrones para acelerar la saturación del doble enlace del ácido metacrílico, se decidió adicionar en esta cinética H_2 en una mezcla $H_2:CO_2$ (80%:20%) a la fase gaseosa de las botellas serológicas, como se describe en el apartado 4.4 de Materiales y Métodos. La presión parcial de hidrógeno al inicio fue de 1.057 atm, la concentración detectada inicialmente de ácido metacrílico fue de $11.37 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($0.979 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), el pH fue de 6.8 ± 0.15 , la temperatura de trabajo fue de 34°C y la cinética tuvo una duración de 45 días.

El ácido metacrílico se consumió en 24 días, tiempo en el que el ácido isobutírico alcanzó su máxima concentración: $8.59 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 5.6). La velocidad específica de consumo del ácido metacrílico fue de $0.017 \text{ gAM}\cdot(\text{gSSV}\cdot\text{d})^{-1}$.

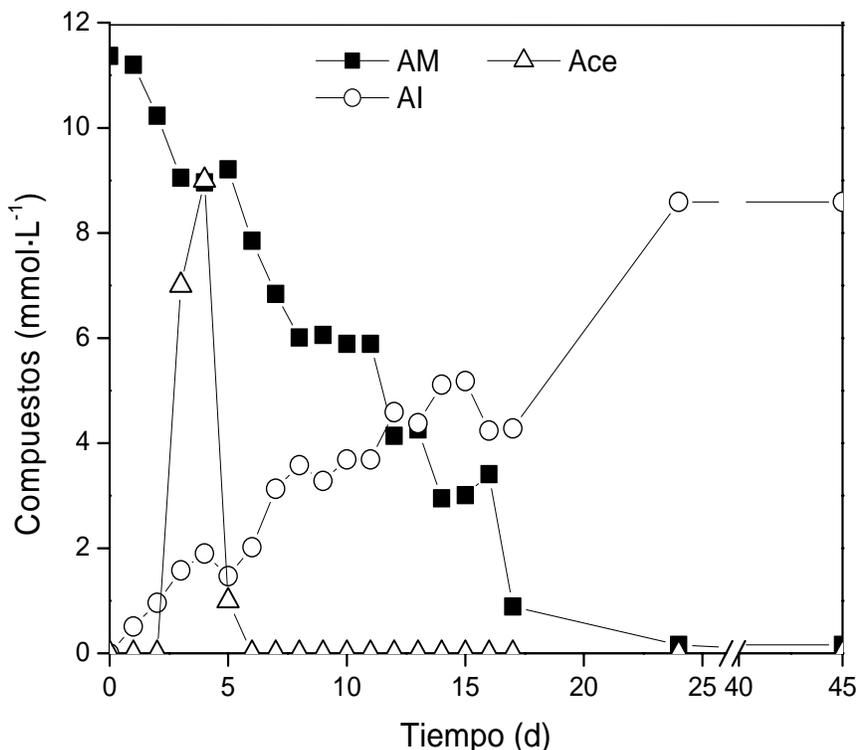


Figura 5.6 Degradación del ácido metacrílico en presencia de hidrógeno molecular. Obsérvese la formación de acetato durante los primeros 4 días. AM) ácido metacrílico; AI) ácido isobutírico; Ace) acetato.

La adición de H_2 no tuvo un efecto importante en la transformación del ácido metacrílico, ya que la velocidad específica de consumo de ácido metacrílico ($0.015 \text{ gAM}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), fue muy similar a la obtenida en la cinética descrita anteriormente en el apartado 5.1.1. Durante la cinética se detectó acetato a partir del día 2 que alcanzó una concentración máxima de $9 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ y que se agotó en el sexto día (Figura 5.6). El acetato formado durante la cinética tampoco influyó en la velocidad de transformación, como lo habían reportado Shtarkman *et al.* (1993 y 1995), quienes reportaron que la oxidación del ácido metacrílico en isobutírico se ve favorecida por la presencia de acetato.

Es probable que el hidrógeno no haya sido utilizado por las bacterias para la reducción del ácido metacrílico, ya que la presencia de acetato permite inferir que el hidrógeno presente fue consumido principalmente por las bacterias hidrogenotróficas y homoacetogénicas (Thauer *et al.*, 1989; Drake, 1994) para la producción de metano y acetato (ec. 5.2 y ec. 5.3 respectivamente), reacciones que son favorables por el valor de ΔG° que presentan.



Debido a que no hubo un efecto del acetato y del H_2 sobre la velocidad de saturación, se podría considerar que los microorganismos que llevaron a cabo la formación de ácido isobutírico pueden ser diferentes a las bacterias *Geobacter sulfurreducens* y *Wolinella succinogenes* (Mikoulińska *et al.*, 1999; Gross *et al.*, 2001), las cuales utilizan el H_2 y el acetato como fuente de electrones (Caccavo *et al.*, 1994; Kröger *et al.*, 2002) para la saturación del ácido metacrílico.

Debido a que la concentración que alcanzó el isobutírico en el día 24 ($8.59 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) permaneció casi constante hasta el final de la cinética, y a pesar de que hubo una disminución apreciable en la presión parcial del H_2 debido su consumo en un 87% para la formación de acetato, en este trabajo se considera que la presión parcial inicial de hidrógeno en la cinética (1.057 atm), pudo tener un efecto inhibitorio en las bacterias que intervienen en la isomerización de isobutírico (Shelton y Tiedje, 1984; Wu *et al.*, 1994) a nivel de la enzima isobutiril-CoA mutasa como lo describieron Matthies y Schink (1992), la cual en conjunto con la enzima butiril-CoA y la coenzima B_{12} llevan a cabo la isomerización por la migración del grupo carboxilo al carbono adyacente,.

Esta suposición se apoya en lo reportado por Lovley y Klug (1982), quienes encontraron que a una presión parcial de hidrogeno de 1 atm, hay una inhibición del 97% en el consumo de isobutírico. Igualmente. Wu *et al.* (1996) también reportaron que a una presión parcial de 0.4 atm, el isobutírico no es consumido.

5.2.2 Dióxido de carbono y metano

La mayor producción de CO₂ se encontró durante los primeros tres días de la cinética, cuando alcanzó una concentración de 2.18 mmol·L⁻¹, que permaneció casi constante hasta el final de la cinética (2.82 mmol·L⁻¹) (Figura 5.7)

Se observó que la producción de CH₄ se inició después de que el acetato fuera consumido en el sexto día (Figura 5.6 y 5.7), alcanzando una máxima concentración de 9.18 mmol·L⁻¹ hacia el final.

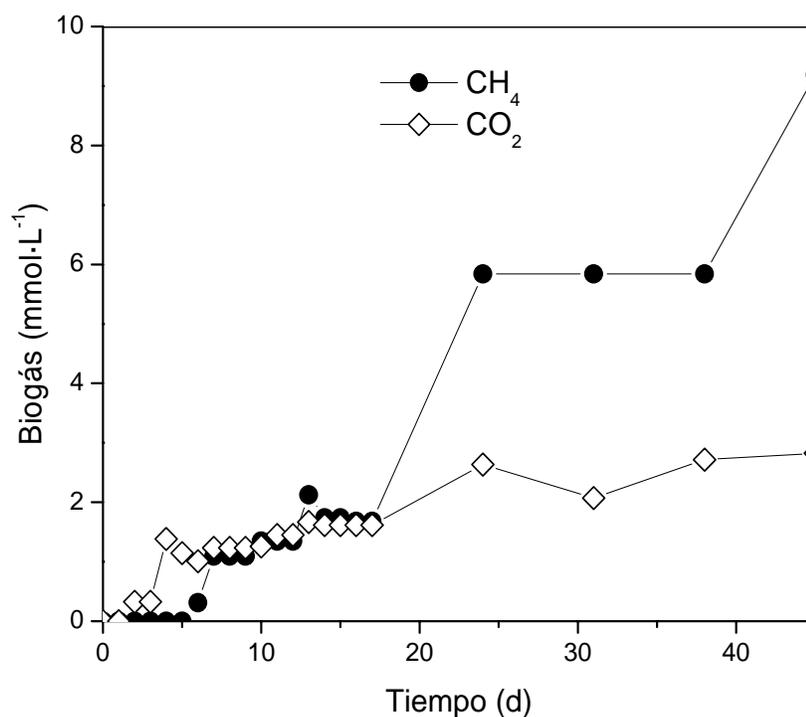


Figura 5.7 Producción de dióxido de carbono y metano en presencia de H₂. La concentración de metano se triplicó durante la segunda mitad del ensayo.

5.2.3 Balance de carbono y formación de polihidroxibutirato (PHB)

Durante la cinética se calculó una recuperación de carbono de 138%, debido al acetato formado en el día 4 (Figura 5.6).

Al término de la cinética se determinó el carbono orgánico total (COT) residual en la fase líquida encontrando $34.55 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, que es aproximadamente equivalente al carbono contenido en el isobutírico detectado por cromatografía de gases en el día 24 ($34.36 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), lo que confirmó que no fue consumido por los microorganismos. El balance mostró una pérdida del 24% del carbono inicial del ácido metacrílico ($45.48 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) con respecto al isobutírico encontrado finalmente, probablemente debido a volatilización (ver Tabla 5.2). La formación de CH_4 y CO_2 provino del acetato formado, aunque se estimó una pérdida aproximadamente de $6.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de acetato. Al no haberse consumido el ácido isobutírico y junto con la formación de CH_4 y CO_2 se obtuvo una recuperación del 102 % de carbono al final de la cinética con respecto al carbono alimentado,

Al realizar las tinciones en esta cinética con Azul de Nilo, no se detectó la presencia de PHB en el lodo.

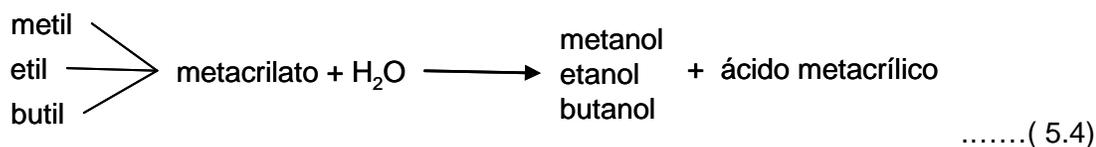
Tabla 5.2 Carbono recuperado durante la degradación del ácido metacrílico en presencia de $\text{H}_2:\text{CO}_2$ ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$).

Tiempo (d)	Fase líquida			Fase gas		Total recuperado (%)
	Ácido Metacrílico	Ácido Isobutírico	Acetato	CH_4	CO_2	
0	45.48	0	0	0	0	100
4	35.84	7.6	18	0	1.38	138
24	0.64	34.36	0	5.84	2.63	95.58
45	0	34.36	0	9.18	2.63	102

5.3 Cinética de degradación de metil, etil y butil metacrilato en mezcla

5.3.1 Metil, etil y butil metacrilato

En esta cinética se calcularon las concentraciones de metil, etil y butil metacrilato de acuerdo a la relación estequiométrica de la siguiente ecuación para obtener una concentración de ácido metacrílico de $11.61 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).



Las concentraciones detectadas inicialmente para el metil, etil y butil metacrilato se muestran en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3 Concentraciones de metacrilatos en el ensayo de biodegradabilidad en mezcla.

Compuesto	Concentración teórica ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Concentración real ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)
MM	3.87	3.32
EM	3.87	2.84
BM	3.87	1.17

No se alcanzaron las concentraciones teóricas debido a la volatilidad de los compuestos, la cual se aparentemente se incrementó en función del número de carbonos cuando los compuestos se mezclaron.

En la Figura 5.8 se muestra el perfil de hidrólisis de la mezcla de metacrilatos y la formación de metanol, ácido metacrílico e isobutírico como intermediarios. El enlace éster es hidrolizado como paso inicial en la degradación, como se ha reportado para otros ésteres del acrílico (Castilla *et al.*, 2004).

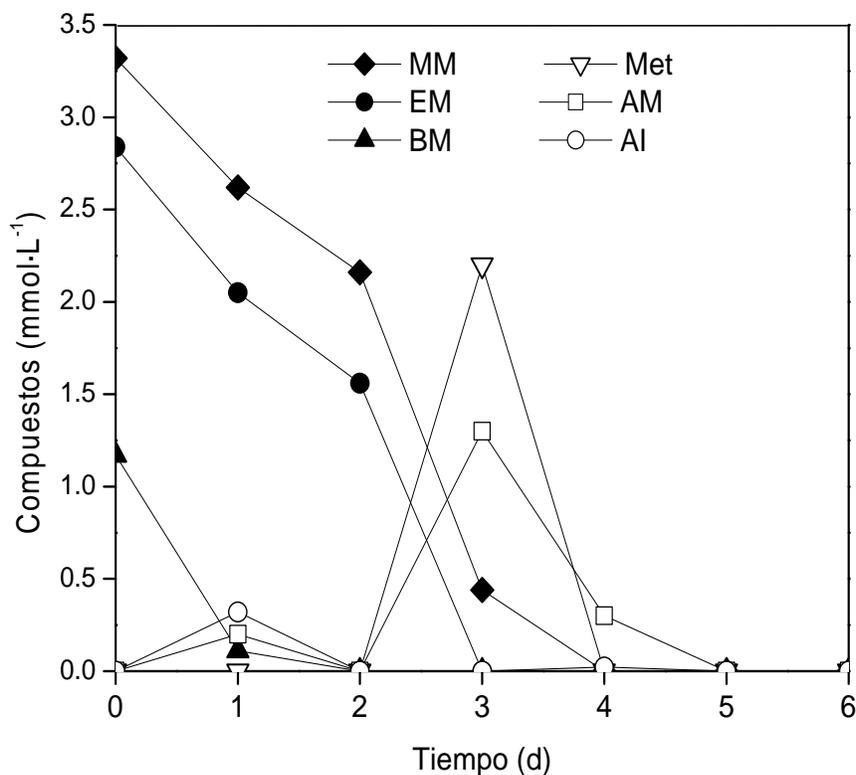


Figura 5.8 Degradación de la mezcla de metacrilatos. MM) metil metacrilato; EM) etil metacrilato; BM) butil metacrilato; Met) metanol; AM) ácido metacrílico; AI) ácido isobutírico.

El butil y etil metacrilato fueron consumidos dentro de los primeros 3 días, mientras que el metil metacrilato fue consumido en un 87% en este tiempo (Figura 5.8), que fue cuando se detectó la mayor concentración de metanol ($2.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) y ácido metacrílico ($1.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). Durante la cinética no se detectó etanol ni acetato. Después del día 5 se agotaron los intermediarios. En esta cinética se realizaron tinciones y no se encontró la formación de PHB, ni se observó la producción de biogás.

Las velocidades calculadas de hidrólisis para el metil, etil y butil metacrilato fueron 0.017 , 0.019 y $0.027 \text{ gCompuesto}\cdot(\text{gSSV}\cdot\text{d})^{-1}$, respectivamente. Estos valores fueron altos debido a que la concentración encontrada de los metacrilatos fue mucho menor a la concentración esperada, por lo que se consumieron en tiempos cortos aumentando la magnitud numérica del valor de velocidad que está relacionado al tiempo.

5.4 Cinética de ácido metacrílico y alcoholes

5.4.1 Ácido metacrílico, metanol, etanol y butanol

Se consideró que los resultados obtenidos en la cinética anterior no son representativos. Por tal motivo y para evitar pérdida por volatilidad de los compuestos, se agregó el ácido metacrílico a una concentración de $11.61 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ y los alcoholes correspondientes derivados de la hidrólisis de cada metacrilato: metanol, etanol y butanol a una concentración cada uno de $3.87 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. La cinética se siguió por un periodo de 45 días, el pH se mantuvo en 6.8 ± 0.25 y la temperatura en 34°C .

La concentración de ácido metacrílico al inicio de la cinética fue de $11.32 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ y hacia el segundo día se consumió el 74% (Figura 5.9), por lo que la mayor producción de ácido isobutírico se observó en este tiempo. Como se muestra en la Figura 5.9a, el ácido metacrílico se agotó en el sexto día, presentando una velocidad específica de consumo de $0.063 \text{ gAM}(\text{gSSV}\cdot\text{d})^{-1}$.

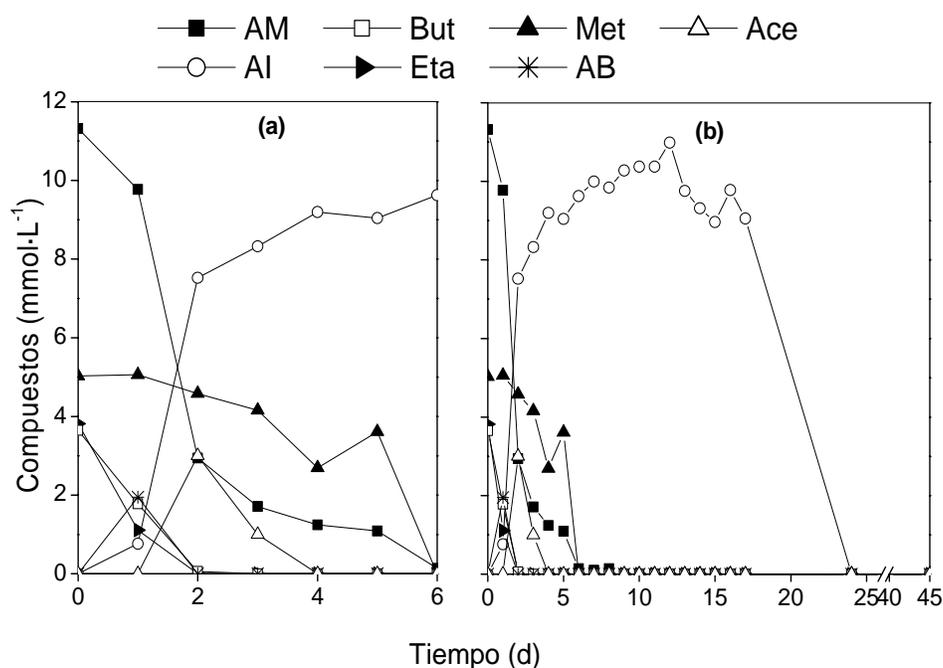
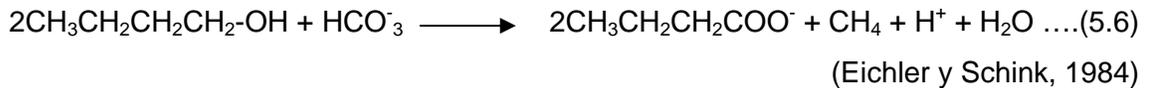
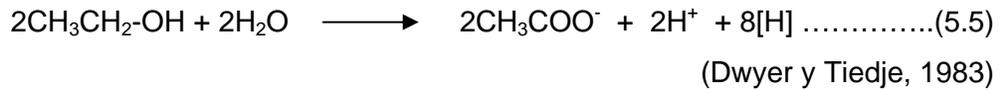


Figura 5.9 (a) Degradación de ácido metacrílico y alcoholes durante los primeros 6 días. (b) Formación y consumo de isobutírico. AM) ácido metacrílico; AI) ácido isobutírico; But) butanol; Eta) etanol; Met) metanol; AB) ácido butírico; Ace) acetato.

Aparentemente la rápida transformación del ácido metacrílico se vio favorecida por la fermentación del etanol y butanol, ya que es precisamente al segundo día cuando se consumieron estos y fue transformado en un 74%. En este momento el ácido isobutírico alcanzó una concentración de $7.52 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, que corresponde al 68% con respecto a la concentración más alta detectada de $10.98 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (día 12), como se puede observar en la Figura 5.9. La fermentación de ambos alcoholes produjo acetato y butirato (ec. 5.5 y 5.6, Figura 5.10), estos intermediarios fueron consumidos hacia el día 4 lo que incrementó la producción de metano (Figura 5.10 y 5.11).



Las reacciones involucradas en esta cinética y que ocurrieron en algunos casos de manera simultánea y en otros en secuencia, se muestran en la siguiente Figura.

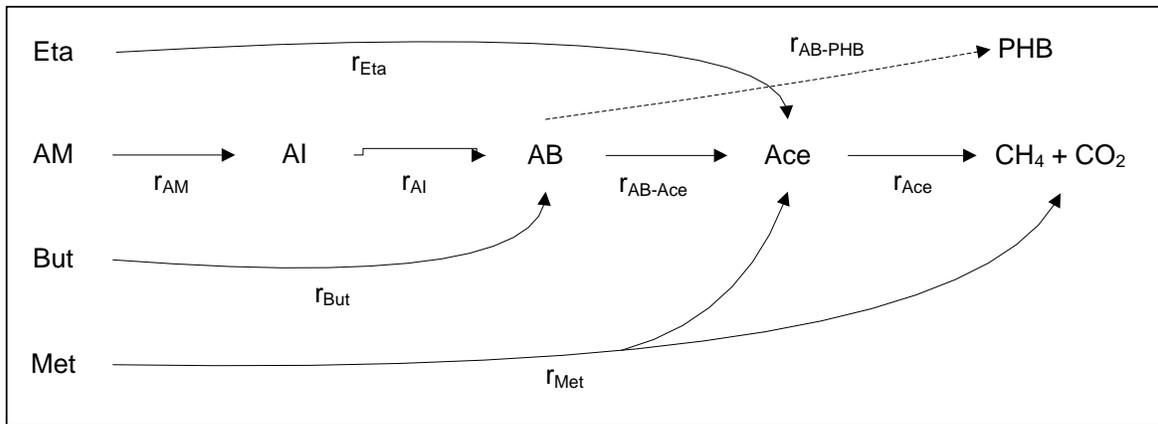


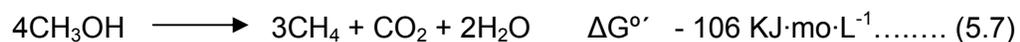
Figura 5.10 Reacciones implicadas en la degradación del ácido metacrílico y alcoholes. AM) ácido metacrílico; Al) ácido isobutírico; But) butanol; Eta) etanol; Met) metanol; AB) ácido butírico; Ace) acetato.

La velocidad específica de consumo del ácido metacrílico fue superior a la de las cinéticas descritas en los apartados 5.1 y 5.2 de este Capítulo, como se muestra en la Tabla 5.4. El incremento en la velocidad, posiblemente se debió al hidrógeno generado a nivel citoplasmático a partir del etanol (ec. 5.5), el cual pudo ser utilizado más eficientemente para la saturación del doble enlace del ácido metacrílico. A nivel citoplasmático, la utilización de electrones derivados del H₂ que se producen por la fermentación del etanol, se lleva a cabo por la ruta metabólica de la acetil-CoA (Müller y Gottschalk, 1994).

Tabla 5.4 Velocidad específica de consumo del ácido metacrílico en las diferentes cinéticas.

Cinética	Vel. específica de consumo [gCompuesto·(gSSV·d) ⁻¹]
AM	0.015
AM + H ₂	0.017
AM + alcoholes	0.063

Por su parte el metanol se consumió lentamente durante la cinética y aparentemente no intervino en la transformación del ácido metacrílico (Figura 5.9). Se sabe que las enzimas implicadas en el metabolismo del metanol requieren de un periodo de activación para reducir el metanol hasta metano por metilotrofia (Keltjens y Vogels, 1993).



En esta cinética tampoco se pudo observar un efecto del acetato formado en la saturación del ácido metacrílico.

Como se mencionó anteriormente la mayor producción de ácido isobutírico se presentó en el segundo día y continuó por un periodo de 10 días a una velocidad de 2.84 mmol·L⁻¹·d⁻¹ hasta alcanzar una máxima concentración de 10.98 mmol·L⁻¹ (Figura 5.9). A

partir de este momento, el ácido isobutírico se consumió lentamente durante 5 días, posiblemente debido a una etapa de adaptación del lodo al isobutírico, ya que fue consumido a partir del día 17 agotándose en el día 24 (Figura 5.9b). Después del consumo del isobutírico no se detectó la formación de butirato y/o acetato (Figura 5.9b y 5.10).

5.4.2 Dióxido de carbono y metano

Durante los primeros 3 días se produjo el 70% del CO_2 total, el cual permaneció casi a una concentración de $3.89 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 5.11). En cambio, la producción de CH_4 se realizó en dos etapas, la primera se llevó a cabo al inicio de la cinética durante tres días, debido a la fermentación del etanol y butanol y se produjeron $7.48 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. La segunda se presentó después del día 14 y alcanzó una concentración final de $22.46 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Este incremento se debió al consumo del acetato, butanol y metanol (Florencio *et al.*, 1993).

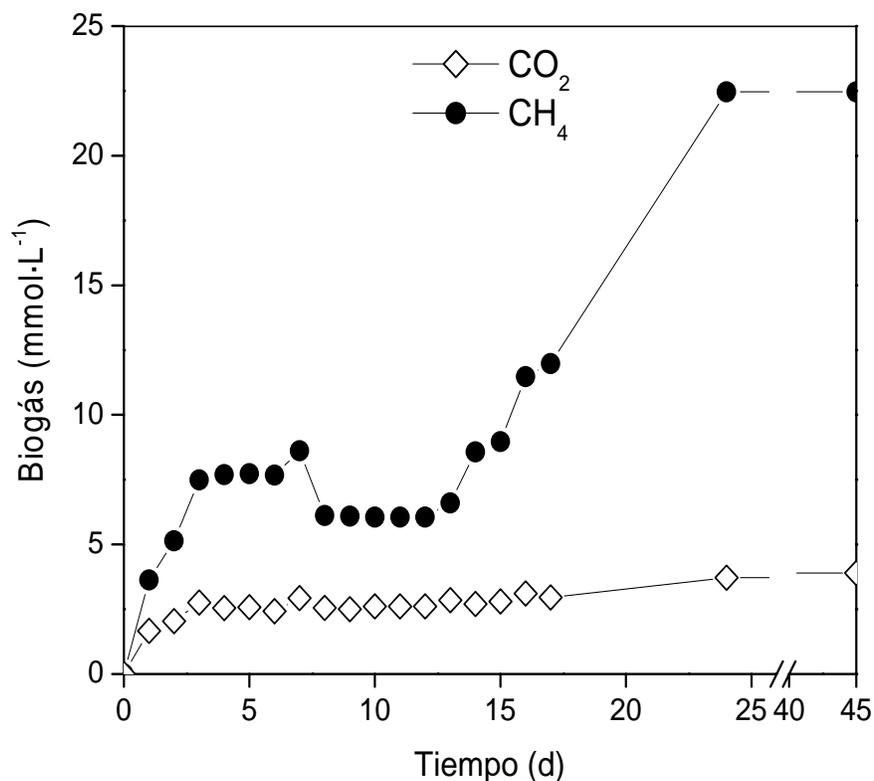


Figura 5.11 Formación de dióxido de carbono y metano. Obsérvese el incremento en la concentración del metano hacia el final de la primera mitad de la cinética.

5.4.3 Balance de carbono y formación de polihidroxibutirato (PHB)

En la Tabla 5.5 se muestra el balance de carbono a diferentes tiempos de la cinética. El ácido isobutírico detectado en el día 6 provino del ácido metacrílico, pudo transformarse a butírico (r_{Al}) y posteriormente a acetato (r_{AB-Ace}) para finalmente ser mineralizado (r_{Ace}) (ver Figura 5.10).

Al final de la cinética sólo se recuperó un 36.3% de carbono como CH_4 y CO_2 , y el ácido isobutírico fue consumido (Figura 5.9, Tabla 5.5), por lo que se detectó un faltante de carbono de 63.7%. El cual se corroboró al analizar el carbono orgánico total de la fase líquida, encontrando una concentración de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, que representa aproximadamente el 1% del carbono orgánico alimentado (Tabla 5.5).

Tabla 5.5 Carbono recuperado a diferentes tiempos en la cinética de ácido metacrílico adicionada de alcoholes ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$).

Tiempo (d)	Fase líquida						Fase gaseosa		Total recuperado (%)
	AM	Met	Eta	But	Al	Ace	CO_2	CH_4	
0	45.28	5.03	7.64	14.6	0	0	0	0	100
2	11.76	4.58	0	0	30.06	6	2.04	5.13	82.1
6	0.56	0	0	0	38.48	0	2.42	7.67	67.7
45	0	0	0	0	0	0	3.9	22.46	36.3

AM) ácido metacrílico; Met) metanol; Eta) etanol; But) butanol; Al) ácido isobutírico; Ace) acetato.

Al no encontrarse el carbono en la fase líquida, se infirió que fue almacenado en forma de PHB y se procedió a hacer tinciones con Azul de Nilo al final del experimento. Se detectaron gránulos de PHB (Figuras 5.13 y 5.14), por lo que el carbono faltante se encontró en forma de este polímero. También se observó que la presencia de los gránulos de PHB se almacenaron en células con diferentes morfologías, como bacilos y cocos, lo que dio evidencia de que se encontraron en el lodo diversas bacterias capaces de

sintetizar este tipo de polímeros. En este caso se aprecia nuevamente el efecto inductor de este compuesto sobre los microorganismos para la formación PHB.

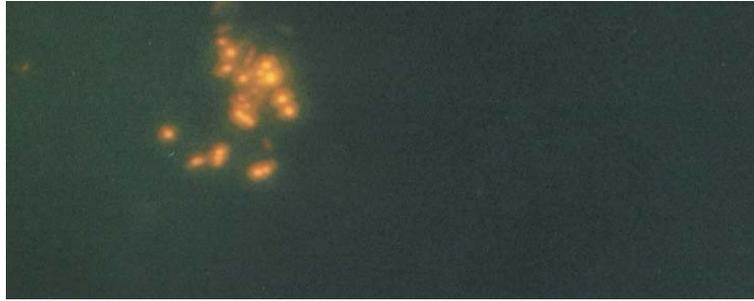


Figura 5.12 Fotografía de fluorescencia de microorganismos provenientes de la cinética de ácido metacrílico y alcoholes, en donde se puede ver un cúmulo de bacterias con gránulos de PHB.



Figura 5.13 Gránulos intracelulares de PHB en un bacilo: (a) contraste de fases (100x), (b) fluorescencia en color naranja (460 nm).

5.5 Toxicidad de Metacrilatos

Para evaluar el efecto de los metacrilatos sobre la producción de metano, se determinó la CI_{50} de cada uno de los compuestos, por medio de pruebas de toxicidad como se describe en el apartado 4.4.3 del Capítulo de Material y Métodos. Las concentraciones utilizadas para cada compuesto se calcularon para que la concentración más alta, alcanzara una inhibición de aproximadamente el 80% con respecto a la máxima actividad de cada cinética. Los resultados se muestran en la Tabla 5.6 y las Figuras 5.14, 5.15 y 5.16.

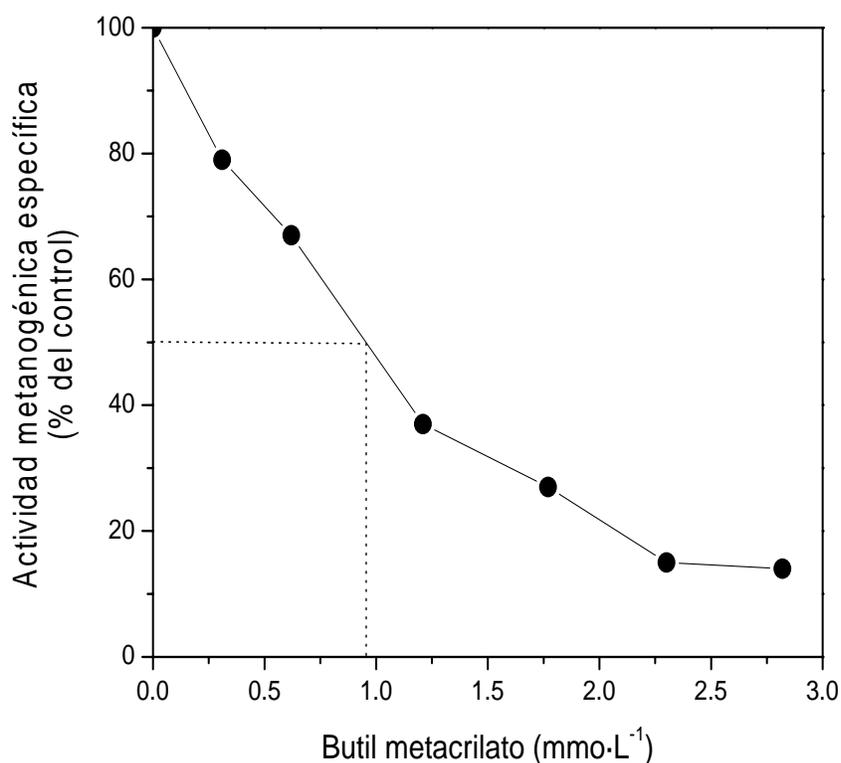


Figura 5.14 Concentración de butil metacrilato a la que se inhibe el 50% de la actividad metanogénica acetoclástica.

Como se observa en la Figura 5.14, la actividad metanogénica decreció de forma lineal hasta una concentración de $1.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de butil metacrilato. La CI_{50} encontrada para el butil metacrilato fue de $0.95 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$.

En la Figura 5.15 se muestra la toxicidad del etil metacrilato sobre la actividad metanogénica. Se observó que entre 2 y 5 mmol·L⁻¹ disminuyó rápidamente. Por arriba de 5 mmol·L⁻¹ la actividad se reduce lentamente. La CI₅₀ encontrada para el etil metacrilato fue de 3.75 mmol·L⁻¹.

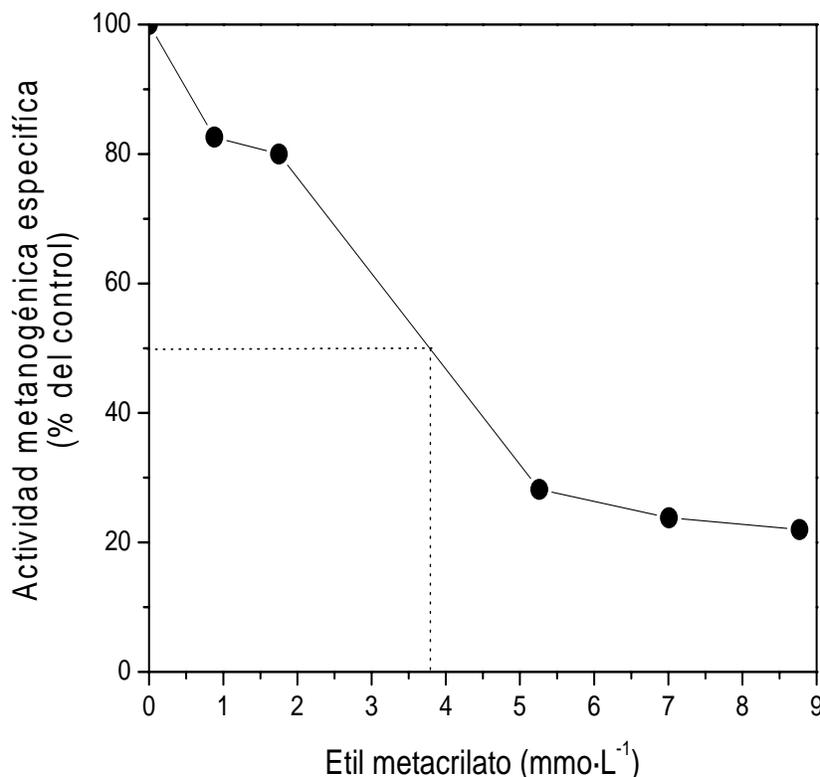


Figura 5.15 Concentración de etil metacrilato a la que se inhibe el 50% de la actividad metanogénica acetoclástica.

En la Figura 5.16 (A) se muestra que la actividad metanogénica disminuyó en forma lineal conforme las concentraciones de metil metacrilato se incrementaron, esta tendencia se observó hasta una concentración de 37.98 mmol·L⁻¹, en donde la actividad se vio reducida a 26%. La CI₅₀ encontrada para el metil metacrilato fue de 27.82 mmol·L⁻¹.

En la Figura 5.16 (B) concentraciones entre 23 y 35 mmol·L⁻¹ de ácido metacrílico redujeron a 37% la actividad metanogénica. Se observó que concentraciones por arriba de 35 mmol·L⁻¹ no tuvieron un efecto inhibitorio importante.

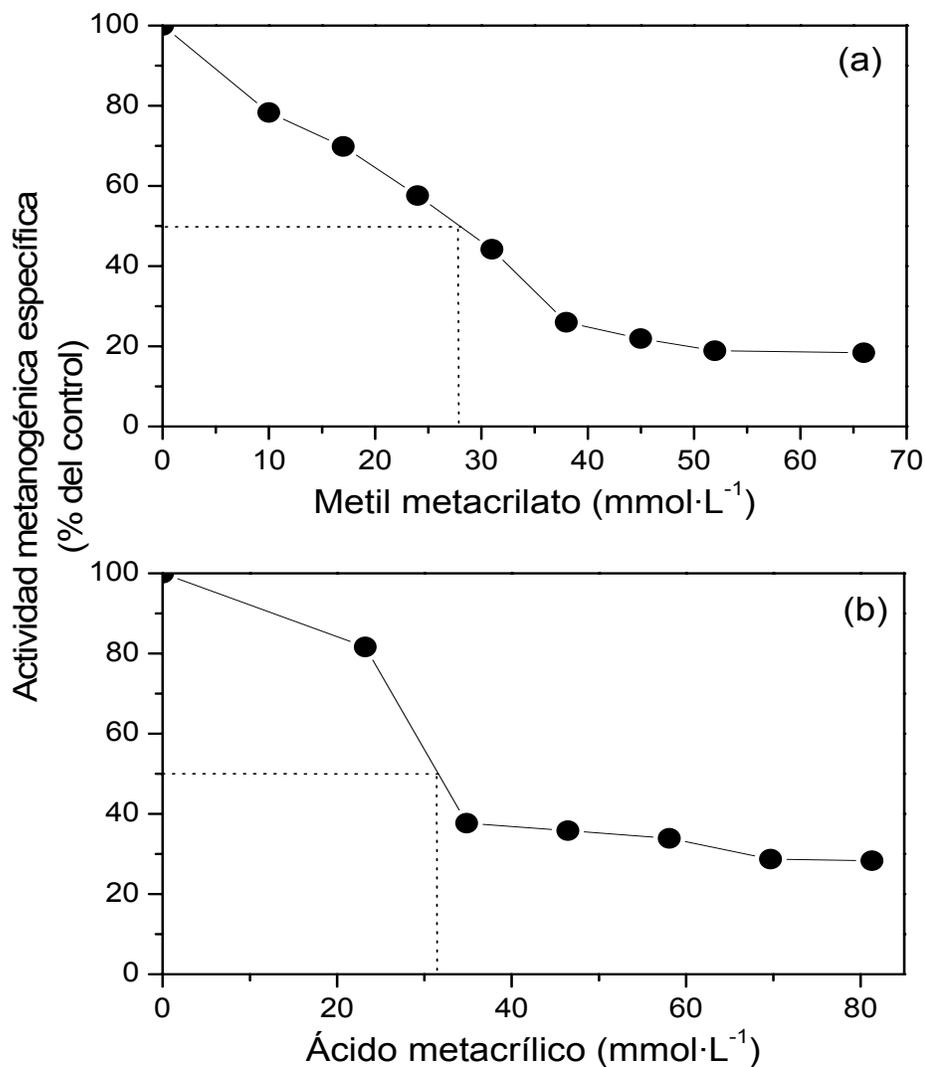


Figura 5.16 Concentración de metil metacrilato **(a)** y ácido metacrílico **(b)**, en donde se inhibe el 50% de la actividad metanogénica acetoclástica.

La CI_{50} encontrada para el ácido metacrílico fue de $31.47 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, y cabe destacar que en las cinéticas de degradación la concentración utilizada de este compuesto ($11.61 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) fue tres veces menor a la CI_{50} .

Esto permite inferir que la falta de producción de metano no se debió a una inhibición por sustrato sino posiblemente a un efecto de inducción del ácido metacrílico en algunas encimas de la β -oxidación para la formación de PHB.

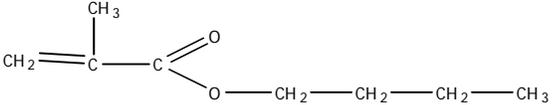
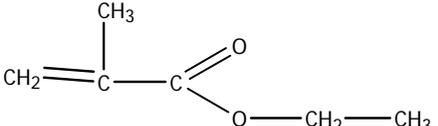
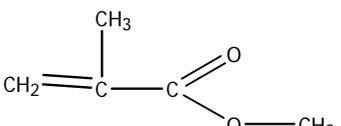
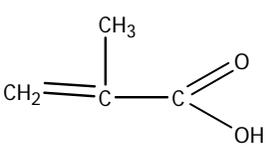
En la siguiente tabla se comparan los valores de Cl_{50} para cada compuesto.

Tabla 5.6 Concentraciones inhibitorias Cl_{50} de los metacrilatos.

Compuesto	Cl_{50} $mmol \cdot L^{-1} (mg \cdot L^{-1})$
Butil metacrilato	0.95 (134.97)
Etil metacrilato	3.75 (427.72)
Metil metacrilato	27.82 (2783.39)
Ácido metacrílico	31.47 (2709.25)

Por otro parte, la comparación entre estos resultados, sugiere que existe una relación directa entre el número de carbonos del alcohol unido al enlace éster con la toxicidad, como se muestra en la Tabla 5.7. Ya que como se pudo observar en los resultados de la Cl_{50} , entre mas carbonos tenga el alcohol, más tóxico se vuelve el compuesto para los microorganismos.

Tabla 5.7 Cl_{50} y estructura química de los metacrilatos.

Compuesto	Cl_{50} ($mmol \cdot L^{-1}$)	Estructura
Butil metacrilato	0.95	
Etil metacrilato	3.75	
Metil metacrilato	27.82	
Ácido metacrílico	31.47	

La manera como influye el número de carbonos con la toxicidad no está del todo claro. Una posible causa pudiera estar dada por la combinación de las propiedades físico-químicas que presentan esta clase de compuestos, ya que por su estructura química pueden presentar propiedades tanto de una cetona como de un éster. A su vez el tener un enlace conjugado le profiere otras propiedades químicas (Morrison y Boyd, 1985), las cuales podrían ser las causantes de la toxicidad sobre las bacterias. En un estudio realizado por Chou *et al.* (1978), evaluaron la toxicidad de diferentes compuestos orgánicos sobre la actividad metanogénica, encontrando que la posición del grupo funcional y los dobles enlaces carbono-carbono incrementan la toxicidad del compuesto. En otro estudio llevado a cabo por Jung *et al.* (1993) en donde analizaron tres compuestos de diferente estructura molecular, encontraron que conforme la molécula es más compleja, la toxicidad del compuesto se va incrementando.

Estos estudios sugieren que hay una estrecha relación entre la estructura molecular y la toxicidad como se observó en esta investigación. También se infiere que estas moléculas son capaces de difundirse a través de los gránulos del lodo, afectando la actividad metanogénica acetoclástica.

6. Conclusiones

La transformación del ácido metacrílico a isobutírico se lleva a cabo lentamente en condiciones anaerobias con lodos no adaptados a estos compuestos. La adición de H₂ no mejoró la velocidad de transformación del ácido metacrílico y se considera que la acumulación de ácido isobutírico y la baja mineralización se debió a una inhibición por la alta presión parcial del hidrógeno.

Igualmente, el acetato producido en esta cinética no fue utilizado como donador de electrones, lo que difiere con lo reportado por Shtarkman *et al.* (1995 y 1993). Por lo que se concluye que la presencia de estos no modificó la velocidad de transformación y por lo tanto, no son utilizados como co-sustratos.

En el caso de la fermentación del ácido metacrílico adicionado con alcoholes, el proceso se vio favorecido por la presencia de H₂ producido durante la fermentación de los alcoholes. Está reportado que la producción de este metabolito se lleva a cabo a nivel intracelular, por lo que se encuentra fácilmente disponible para los microorganismos.

Durante la degradación de ácido metacrílico y ácido metacrílico adicionado con alcoholes se produjo PHB que fue detectado por tinción con Azul de Nilo y fluorescencia. De estos experimentos se concluye que, el ácido metacrílico actúa como inductor sobre los microorganismos fermentativos presentes en los lodos anaerobios, para la formación de PHB.

La falta de producción de biogás en estas cinéticas, se pudo deber a un efecto inductor del ácido metacrílico en la vía metabólica de la β -oxidación sobre la formación de PHB. No fue debido a toxicidad por la concentración adicionada del compuesto, ya que la Cl₅₀ encontrada para el ácido metacrílico (31.47 mmol·L⁻¹) fue casi tres veces mayor a la alimentada (12.15 mmol·L⁻¹ ± 1.18).

Se encontró una relación entre el número de carbonos de los ésteres del ácido metacrílico y la Cl_{50} , siendo el mas tóxico el butil metacrilato y el menos tóxico el ácido metacrílico.

7. Bibliografía

- APHA-AWA-WPCF, (1995) Standard methods for the examination of water and wastewater, 19a. edición, American Public Health Association, Washington, D.C., U.S.A.
- Aguilar, A., Casa, C., Lafuente, J. and Lema, J.M. (1990). Kinetic modeling of isomerization and anaerobic degradation of n- and i-Butyrate. *J. Ferment. Bioeng.* **69** (4):261-264
- Aguilar, A., Casa, C. and Lema, J.M. (1995). Degradation of volatile fatty acids by differently enriched methanogenic cultures: kinetics and Inhibition. *Wat. Res.* **29**(2):505-509.
- Amos, D.A. and McInerney, M.J. (1991). Composition of poly- β -hydroxyalkanoate from *Syntrophomonas wolfei* grown on unsaturated fatty acid substrates. *Arch. Microbiol.* **155**:103-106.
- Angelidaki, I. and Ahring, B.K. (1995). Isomerization of n- and i-butyrate in anaerobic methanogenic systems. *Antonie van Leeuwenhoek.* **68**:285-291.
- Balch, W.E., Fox, G.E., Magrum, L.J., Woese, C.R. and Wolfe, R.S. (1979). Methanogens: reevaluation of a unique group. *Microbiological Reviews.* **43**(2):260-296.
- Batti, Z.I., Furakawa, K. and Fujita, M. (1996). Feasibility of methanolic waste treatment in UASB reactors. *Wat. Res.* **30**(11):2559-2568.
- Batstone, D. J., Pind, P.F. and Angelidaki, I., (2003). Kinetics of Thermophilic, Anaerobic Oxidation of Straight and Branched Chain Butyrate and Valerate. *Biotechnol. Bioeng.* **84**(2):195- 204.
- Beek, B., Böhring, S., Bruckman, U., Franke, C., Jöhncke, U. and Studinger, G. (2000). The assessment of bioaccumulation. In Beek, B. (ed) The handbook of environmental chemistry. Vol. 2 parte J. pp 5-6.
- Berry, S. (2002). The chemical basis of membrane bioenergetics. *J. Mol. Evol.* **54**:595-613.
- Castilla, P., Luévano, R., Fajardo, C., Monroy, O. and Meraz, M. (2004). Anaerobic biodegradation of selected organic chemicals from the petrochemical industry. 10th World Congress Anaerobic Digestion. Montréal, Canada. 29 agosto- 2 septiembre, pp: 2327-2330.
- Caccavo, F. Jr., Lonergan, D.J., Lovley, D.R., Davis, M., Stolz, J.F. and McInerney, M.J. (1994). *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**(10):3752-3759.
- Chou, W.L., Speece, R.E. Siddiqi, R.H. and McKeon, K. (1978). The effect of petrochemical structure on methane fermentation toxicity. *Wat. Tech.* **10**: 545-558.
- Comisión Nacional del Medio Ambiente (CNMA), 1998. Guía para el control y prevención de la contaminación industrial. Industria elaboradora de pinturas. Santiago, Chile. Pp:22-28.
- Dassonville, F. and Renault, P. (2002). Interactions between microbial processes and geochemical transformations under anaerobic conditions: a review. *Agronomie.* **22**:51-68.
- Drake, H.L. (1994). Acetogenesis, acetogenic bacteria and the acetyl-CoA "Wood/Ljungdahl" pathway: past and current perspectives. In Drake, H.L. (ed) Acetogenesis, Chapman and Hall, New York, NY., pp 3-37.

- Dwyer, D.F. and Tiedje, J.M. (1983). Degradation of ethylene glycol and polyethylene glycols by methanogenic consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**(1):185-190.
- Eichler, B. and Schink, B. (1984). Oxidation of primary aliphatic alcohols by *Acetobacterium carbinolicum* sp. nov., a homoacetogenic anaerobe. *Arch. Microbiol.*, **140**:147-152.
- Florencio, L., Jenicek, P., Field, J. and Lettinga G. (1993). Effect of cobalt on the anaerobic degradation of methanol. *Journal of Fermentation and Bioengineering.* **75**(5):368-374.
- Gross, R., Simon, J. and Kröger, A., (2001). Periplasmic methacrylate reductase activity in *Wolinella succinogenes*, *Arch Microbiol* **176**:310–313
- Han, K. and Levenspiel, O. (1988). Extended Monod kinetics for substrate, product and cell inhibition. *Biotech. Bioeng.* **32**:430-437.
- Jawed, M. and Tare, V. (1999). Microbial composition assessment of anaerobic biomass through methanogenic activity tests. *Water SA.* **25**(3):345-350.
- Jung, J., Sofer, L., and Lakhwala F. (1993). A comparative study on biodegradation of Selected Monomers: effect of molecular structure. *Hazardous Waste and Hazardous Materials.* **10** (1):3-11.
- Keltjens, J.T. and Vogels, G.D. (1993). Conversion of methanol and methylamines to methane and carbon dioxide. En Ferry, J.G. (ed) *Methanogenesis: ecology, physiology, biochemistry and genetics*, Chapman y Hall, New York, NY., pp 287-288.
- Kleerebenzen, R. and Macarie, H. (2003). Treating Industrial wastewater: anaerobic digestion comes age. *Chemical Engineering.* **110** (4):56-64.
- Kröger, A., Biel, S., Simon, J., Gross, R., Uden, G. and Lancaster, C.R.D. (2002). Fumarate respiration of *Wolinella succinogenes*: enzymology, energetics and coupling mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1553**:23-38.
- Lee, S. Y., (1996). Review: Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotech. Bioeng.* **49** :1-14.
- Liu, H., Wu, C. and Lo, J. (2004). Volatile organic compounds in wastewater during treatment. In Beek, B. (ed) *The handbook of environmental chemistry vol.5, Part I.* pp 30-35.
- Lovley, D.R. and Klug, M.J. (1982). Intermediary metabolism of organic matter in the sediments of eutrophic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**(3):552-560
- McLeod, F.A., Guiot, S.R. and Costerton, J.W. (1990). Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(6):1598-1607.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. (2003). *Brook. Biología de los microorganismos*. Decima edición. Ed. Pearson educación S.A. Madrid. 568-578.
- Madison, L.L. and Huisman, G.W. (1999). Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and molecular biology reviews.* **63**(1):21-53.
- Matthies, C. and Schink, B. (1992). Reciprocal isomerization of butyrate and isobutyrate by the strictly anaerobic degradation by a defined triculture. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(5):1435-1439.
- McInerney, M.J., Bryant, M.P., Hespell R.B. and Costerton, J. W. (1981). *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov., an Anaerobic, Syntrophic, Fatty Acid-Oxidizing Bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**(4):1029-1039.
- McInerney, M.J. (1988). Anaerobic hydrolysis and fermentation of fats and proteins. In Zender, A.J.B. (ed). *Biology of anaerobic microorganisms.* pp 373- 376.

- Mikoulinskaia, O., Akimenko, V., Galouchko, A., Thauer, R.T. and Hedderich, R. (1999). Cytochrome c-dependent methacrylate reductase from *Geobacter sulfurreducens* AM-1. *Eur. J. Biochem.* **262**:346-352.
- Mino, T., Van Loosdrecht M.C.M. and Heijnen, J.J. (1998). Review : Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. *Wat. Res.* **32**(11):3193-3207.
- Monroy, O.A. (1998). Modelamiento y control de un sistema de digestión anaerobia en dos etapas. Tesis doctoral. UNAM. México. pp: 6-9.
- Monroy, O., Famá, G., Meraz, M., Montoya, L. and Macarie H. (2000). Anaerobic digestion for wastewater treatment in México: state of technology. *Wat. Res.* **34**(6):1803-1816.
- Morrison, R.T. y Boyd R.N. (1985). *Química orgánica*. Ed. Fondo Educativo Interamericano S.A., México. pp: 1474.
- Müller, V. and Gottschalk, G. (1994). The sodium ion cycle in acetogenic and methanogenic bacteria: generation and utilization of primary electrochemical sodium ion gradient. In Drake, H.L. (ed) *Acetogenesis*, Chapman y Hall, New York, NY., pp 126-148.
- Nemerow, N.L. y Dasgupta, A. (1998). *Tratamiento de vertidos industriales y peligrosos*. (ed) Díaz de Santos, Madrid; España. Pp: 822.
- Olgún-Lora, P. and Razo-Flores, E. (2003). Inhibition of the acetoclastic methanogenic activity by phenol and alkyl phenols. *Environmental Technology.* **24**:999-1006.
- Ostle, A.G. y Holt, J.G. (1982). Nile Blue A as a fluorescent stain for poly- β -hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.* **44** (1):238-241.
- Pind, P.F., Angelidaki, I. y Ahring, B.K. (2003). Dynamics of the anaerobic process: effects of volatile fatty acids. *Biotech. Bioeng.* **82**:791-801.
- Raje, R., Ahmad, S. and Weisbroth, S. (1985). Methylmethacrylate: tissue distribution and pulmonary damage in rats following acute inhalation. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* **50**:151-154.
- Saillenfait, A.M., Bonnet, P., Gallissot, F., Peltier, A. and Fabriés, J.F. (1999). Developmental toxicities of methacrylic acid, ethyl methacrylate, n-butyl methacrylate and allyl methacrylate in rats following inhalation exposure. *Toxicological Sciences.* **50**:136-145.
- Sanders, W.T.M., Zeeman, G. and Stams, A.J.M. (2003). Biosolids: Anaerobic digestion of. In Jonh Wiley & Sons (ed) *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. Wageningen, The Netherlands.
- Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Nakamura, K., Ohashi, A. and Harada, H. (2000). *Syntrophothermus lipocalidus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, syntrophic, fatty-acid-oxidizing anaerobe which utilizes isobutyrate. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* **50**:771-779.
- Schink, B. (1994). Diversity, ecology and isolation of acetogenic bacteria. In Drake, H.L. (ed) *Acetogenesis*, Chapman y Hall, New York, NY., pp 211-212.
- Schink, B. (1997). Energetics of syntrophic cooperations in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **61**:262-280
- Schink, B. (2002). Synergistic interactions in the microbial world. *Antonie van Leeuwenhoek.* **81**:257-261.
- Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). Isolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**(4):840-848.
- Schmidt, J.E. and Arhing, B.K. (1996). Review: Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biotechnol. Bioeng.* **49**:229-246.

- Sijm, D.T.H.M. and Hermens, J.L.M. (2000). Internal effect concentration: Link between bioaccumulation and ecotoxicity for organic chemicals. In Beek, B. (ed) The handbook of environmental chemistry, Vol. 2 parte J. pp 179-180.
- Speece, R.E., (1996). Anaerobic Biotechnology for industrial wastewaters, Archae Press, Tennessee, USA. Pp: 246 y 392.
- Shtarkman, N.B., Laurinavichius, K.S. and Akimenko, V.K. (1993). Pathways of organic matter degradation to methane by adapted and unadapted bacteria in the treatment to waste water from methacrylate manufacture. *Microbiology*. **61**(4): 709-716.
- Shtarkman, N.B., Obratsova, A.Ya., Laurinavichius, K.S., Galushko, A.S. and Akimenko V.K. (1995). Conversión of (meth)acrylic acids to methane granular sludge: initiation by specific anaerobic microflora. *Microbiology*. **64**(2):270-274.
- Stieb, M. and Schink, B. (1989). Anaerobic degradation of isobutyrate by methanogenic enrichment cultures and by a *Desulfococcus multivorans* strain. *Arch. Microbiol.* **151**:126-132.
- Sudesh, K., Abe, H. and Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*. **25**:1503-1555.
- Thauer, R.K., Jungermann, K. and Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews*. **41**(1):100-180.
- Thauer, R.K., Möller-Zinkhan, D. and Sporman, A.M. (1989). Biochemistry of acetate catabolism in anaerobic chemotropic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**:43-67.
- Thauer, R.K. (1998). Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology*. **144**:2377-2406.
- Tholozan, J.L., Samian, E. and Grivet, J.P. (1988). Isomerization between n-butyrate in enrichment cultures. *FEMS Microbiology Ecology*. **53**:187-191.
- Visser, A. (1995). The anaerobic treatment of sulfate containing wastewater. Ph.D. Thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, Holanda.
- Wofford, N.Q., Beaty, P.S. and McInerney, M.J. (1986). Preparation of cell-free extract and the enzymes involved in fatty acid metabolism in *Syntrophomonas wolfei*. *Journal of Bacteriology*. **167**(1):179-185.
- WEF-ASCE (1995) Toxic air emissions from wastewater treatment facilities. Alexandria Va, USA. Water Environment Federation-American Society of civil engineers.
- Wu, W.M., Jain, M.K., Conway de Macario, E., Thiele, J.H. and Zeikus, J.G. (1992). Microbial composition and characterization of prevalent methanogens and acetogens isolated from syntrophic methanogenic granules. *Applied Microbiology and biotechnology*. **38**:282-290.
- Wu, W.M., Jain, M.K. and Zeikus, J.G. (1994). Anaerobic degradation of normal- and branched-chain fatty acids with four or more carbons to methane by a syntrophic methanogenic triculture. *Applied Microbiology and biotechnology*. **60**(7):2220-2226.
- Wu, W.M., Jain, M.K., Hickey, R.F. and Zeikus, J. G. (1996). Perturbation of Syntrophic Isobutyrate and butyrate degradation with formate and hydrogen. *Biotechnol. Bioeng.* **52**:404-411.
- Yamane, T. (1992). Yield of poly-D(-)-3-hydroxybutyrate from various carbon source: a theoretical study. *Biotechnol. Bioeng.* **41**:165-170.
- Yu, H.Q., Mu, Y. and Fang, H.H.P. (2004). Thermodynamic análisis of product formation in mesophilic acidogenesis of lactose. *Biotechnol. Bioeng.* **87**(7):813-822.
- Zeikus, J.G. (1977). The biology of methanogenic bacteria. *Bacteriological Reviews*. **41**(2):514-541.

Zinder, S.H., Cardwell, S.C., Anguish, T., Lee, M. and Koch, M. (1984). Methanogenesis in a thermophilic (58°C) anaerobic digester: *methanotherix* sp. as an Important aceticlastic methanogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**(4):796-807.

Referencias electrónicas

- Concise International Chemical Assessment Document, # 4 (CICAD, 4), 1998
<http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad04.htm#PartNumber:6>
- CEPA 1999 (Canadian Environmental Protection Act)
http://www.ec.gc.ca/substances/ese/eng/psap/PSL1_methyl_methacrylate.cfm
- EPA 1998. U.S. Environmental Protection Agency. Health and Environmental Effects Profile for Methyl Methacrylate. EPA/600/x-85/364. Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment, Office of Research and Development, Cincinnati, OH. 1985.
www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/methylme.html - 31k
- Hazardous Substances Data Bank (HSDB), 2006.
<http://toxnet.nlm.nih.gov>
- INEGI (1999). Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. XV Censo industrial, censos económicos.
<http://www.inegi.gob.mx/inegi/default.asp>
- School of Polymers and High Performance Materials, University of Southern Mississippi, (PSRC.USM).
<http://www.psrc.usm.edu/>

8. Anexos

1. Medios de cultivo

1.1 Medio mineral Balch *et al.* (1979)

Solución mineral 1

Compuesto	g·L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	6

Solución mineral 2

Compuesto	g·L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	6
NH ₄ Cl	2.4
NaCl	12.00
MgCl ₂ ·6H ₂ O	2.10
CaCl ₂ ·H ₂ O	0.16

Oligoelementos

Compuesto	g·L ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.0
MnSO ₄ ·2H ₂ O	0.5
NaCl	1.0
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1
CoCl ₂	0.1
ZnSO ₄	0.1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.01
AlK(SO ₄) ₂	0.01
H ₃ Bo ₃	0.01
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.01

Vitaminas

Compuesto	g·L ⁻¹
Biotina	0.002
Ácido fólico	0.002
Piridoxina	0.01
Tiamina	0.005
Riboflavina	0.005
Ácido pantotéico	0.005
Vitamina B12	0.0001
Ácido p-amino benzoico	0.005
Ácido lipóico	0.005

Solución	g·100 mL ⁻¹ de agua destilada
NiCl ₂	0.005
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.2

Preparación del medio

Solución	mL·L ⁻¹
Mineral 1	50
Mineral 2	50
Oligoelementos	10
Vitaminas	10
Cloruro de níquel	10
Sulfato ferroso	1

1.2 Medio mineral Visser (1995)

Macronutrientes

Compuesto	mg·L ⁻¹
NH ₄ Cl	1044
KCl	270
KH ₂ PO ₄	169
MgCl ₂ ·6H ₂ O	150
CaCl ₂ ·2H ₂ O	50
Extracto de levadura	18
Solución de elementos traza	1 mL·L ⁻¹

Elementos Traza

Compuesto	mg·L ⁻¹
FeCl ₂ ·4H ₂ O	2000
MnCl ₂	500
EDTA	500
Na ₂ SeO ₃	100
H ₃ BO ₃	50
ZnCl ₂	50
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	50
AlCl ₃	50
NiCl ₃ ·6H ₂ O	50
CoCl ₂ ·2H ₂ O	50
CuCl ₂ ·2H ₂ O	50
HCl concentrado	1 mL·L ⁻¹

EDTA = Ácido Etileno Diamino Tetracético

2. Actividad metanogénica específica

Resultados de la actividad metanogénica específica de los lodos provenientes de la planta de tratamiento de aguas residuales de Central de Malta.

Tabla 8.1 Resultados de la actividad metanogénica específica

Sustrato	AME gDQO-CH ₄ (gSSV· d) ⁻¹	gDQO·L ⁻¹ Alimentado	CH ₄ Producido (mL)	CH ₄ Teórico (mL)	mLCH ₄ ·h ⁻¹
Glucosa	0.4674	1.0	12.72	10.2	1.0512

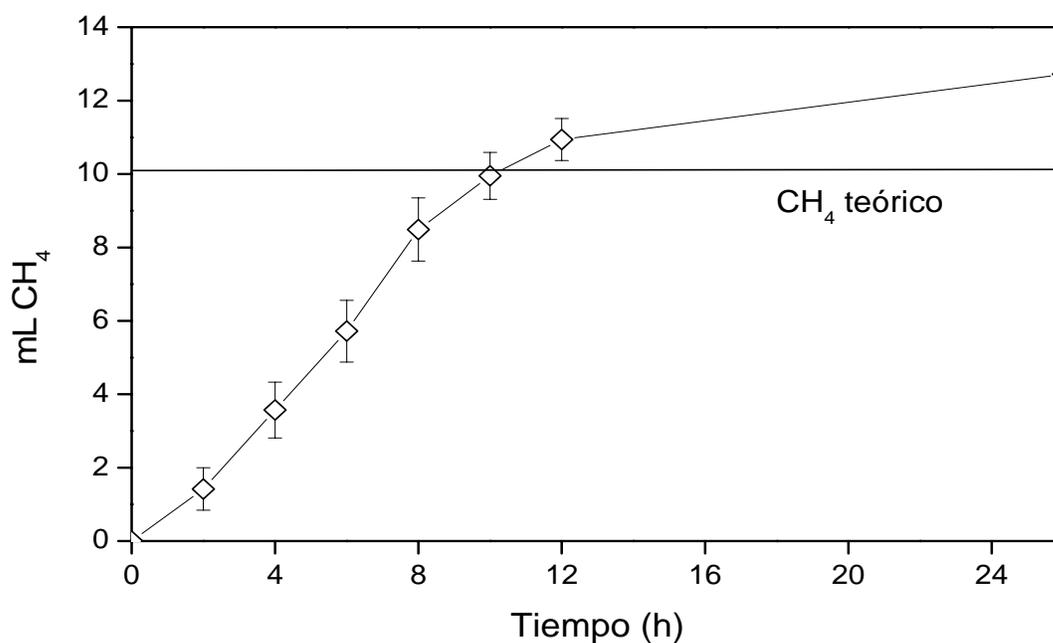


Figura 8.1 Producción de metano con glucosa como sustrato.

Debido a que todo el sustrato fue hidrolizado hasta metano y bióxido de carbono, se puede considerar que el lodo contiene una población balanceada de bacterias fermentativas y arqueobacterias metanogénicas.

4. Curvas estándar

4.1 Curvas estándar de metacrilatos e intermediarios

Las curvas de calibración para los compuestos se realizaron con el método para cromatografía de gases que se describe en el apartado 4.5.1 de Materiales y Métodos.

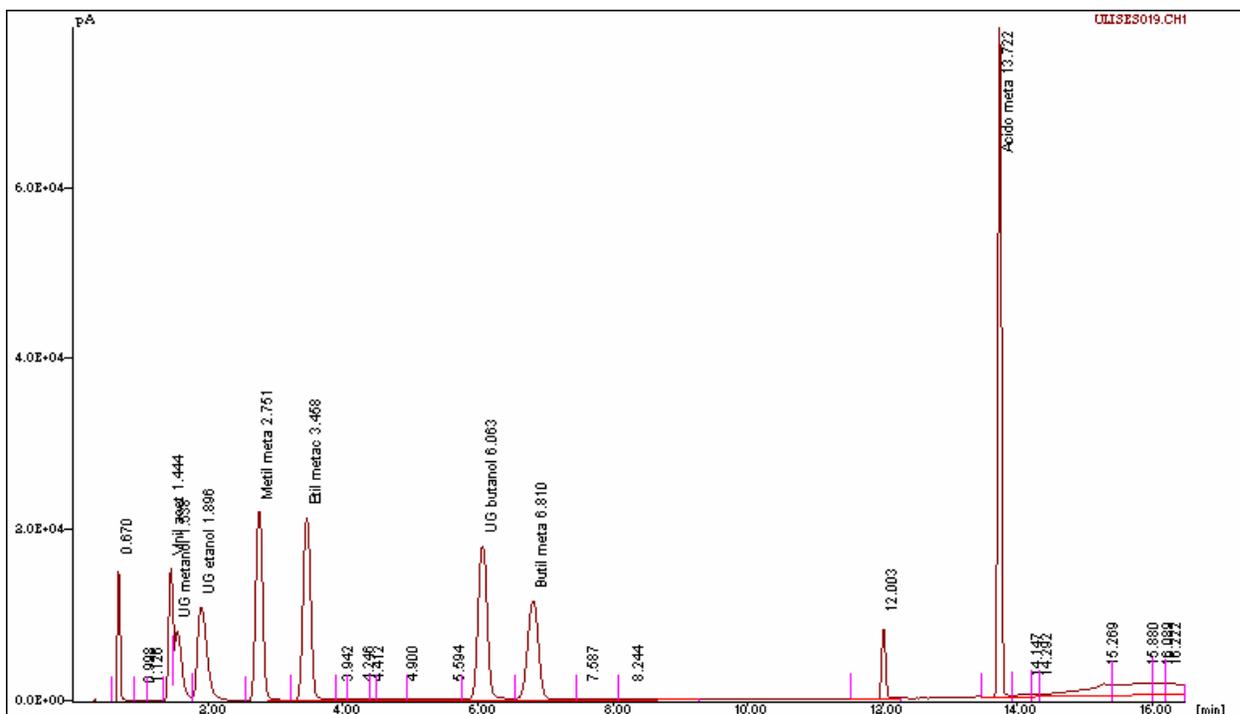


Figura 8.2 Cromatograma de la mezcla de los metacrilatos e intermediarios por cromatografía de gases.

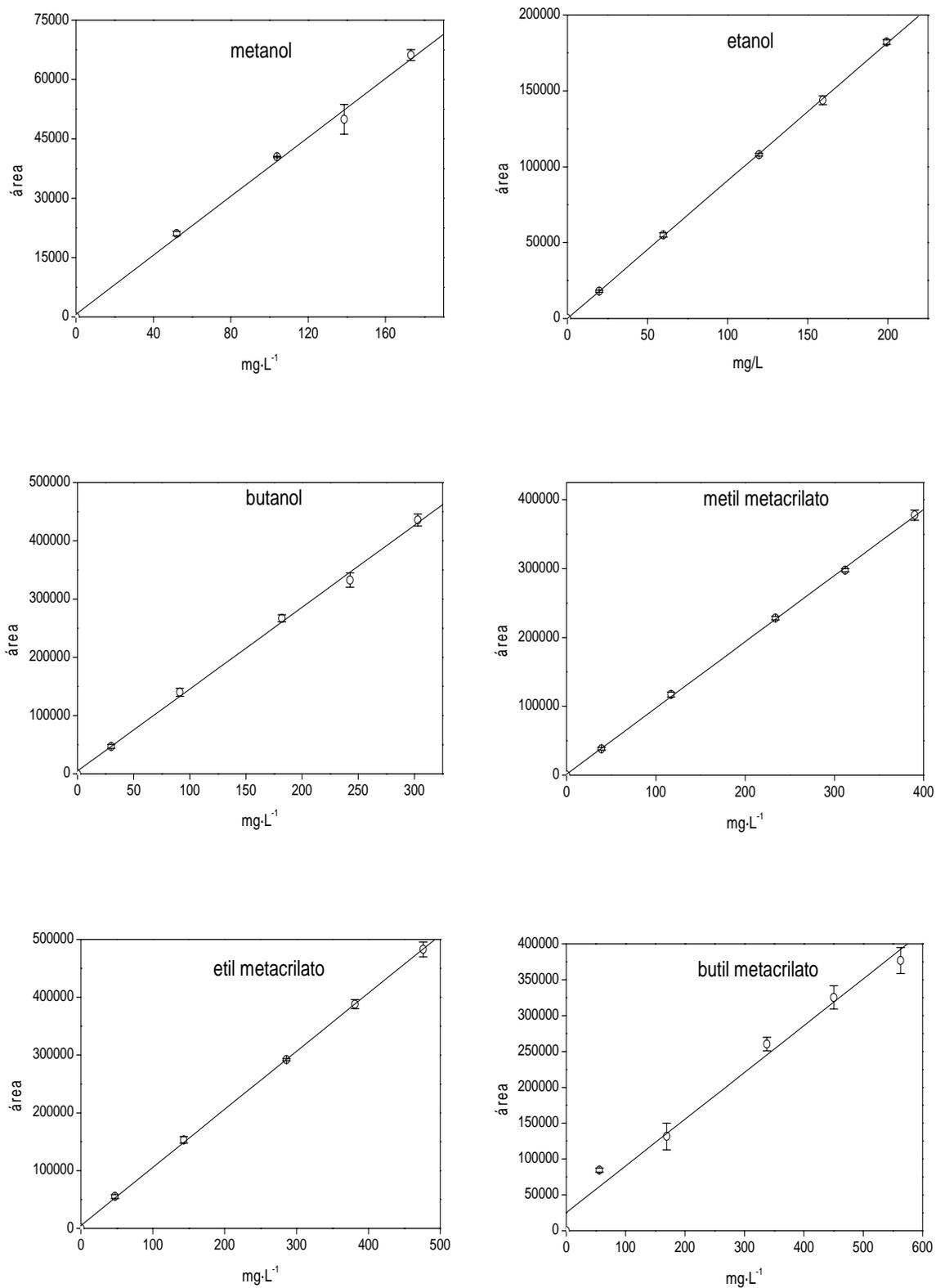


Figura 8.3 Curvas estándar de metacrilatos y alcoholes.

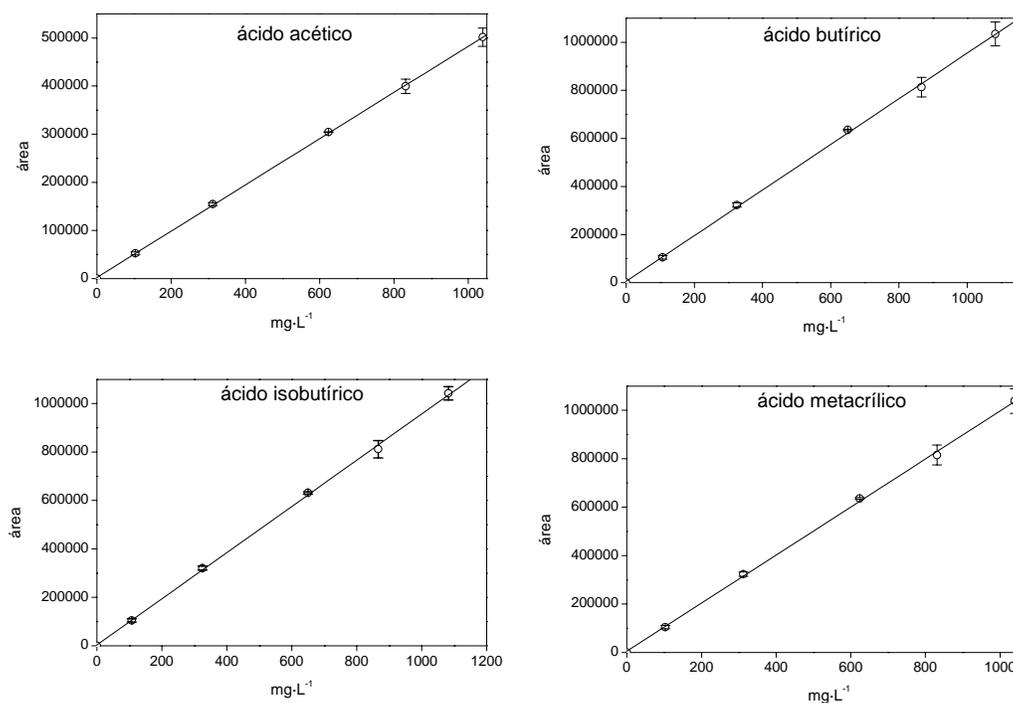


Figura 8.4 Curvas estándar de AGV y ácido metacrílico.

Tabla 8.2 Coeficientes para cada compuesto.

Compuesto	Ecuación	R ²
Metanol	$y = 372.81x + 647.31$	0.996
Etanol	$y = 909.23x + 16.672$	0.999
Butanol	$y = 1406x + 4845.9$	0.997
Metil metacrilato	$y = 961.59x + 1475.5$	0.999
Etil metacrilato	$y = 1005.1x + 5134.1$	0.999
Butil metacrilato	$y = 651.86x + 25195$	0.985
Acetato	$y = 480.65x + 2371.6$	0.999
Butírico	$y = 948.43x + 5907.4$	0.999
Isobutírico	$y = 953.8x + 3325$	0.999
Ácido metacrílico	$y = 992.27x + 5198.5$	0.999

4.2 Curva estándar de metano y dióxido de carbono por cromatografía de gases

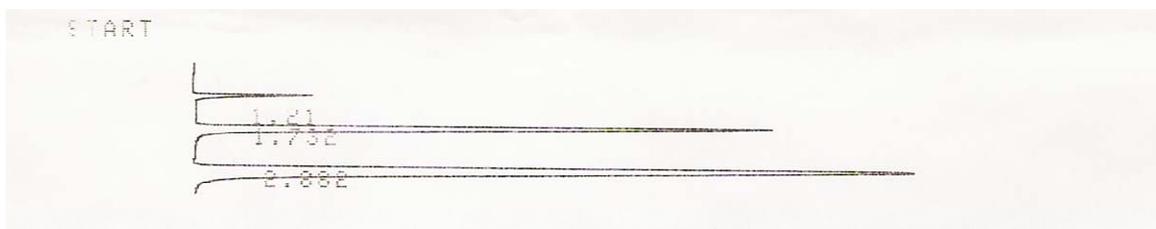


Figura 8.5 Cromatograma de la mezcla de gases CH_4 y CO_2 .

Las curvas se realizaron por triplicado. Se calcularon las moles de gas usando la ec.

8.1.

$$PV = nRT \quad (8.1)$$

Donde

$P = 0.7697 \text{ atm}$ (Presión de la Ciudad de México)

$V = \text{volumen (L)}$

$n = \text{número de moles}$

$$R = 0.082 \frac{\text{atm} \cdot \text{L}}{\text{mol} \cdot ^\circ\text{K}}$$

$T = 298.15 \text{ } ^\circ\text{K}$

Tabla 8.3 Curva estándar de metano.

Volumen (L)	mmol	área
0	0	0
0.002	0.063	16384
0.004	0.126	29992.33
0.006	0.189	43804.33
0.008	0.252	55278
0.01	0.315	74175.67

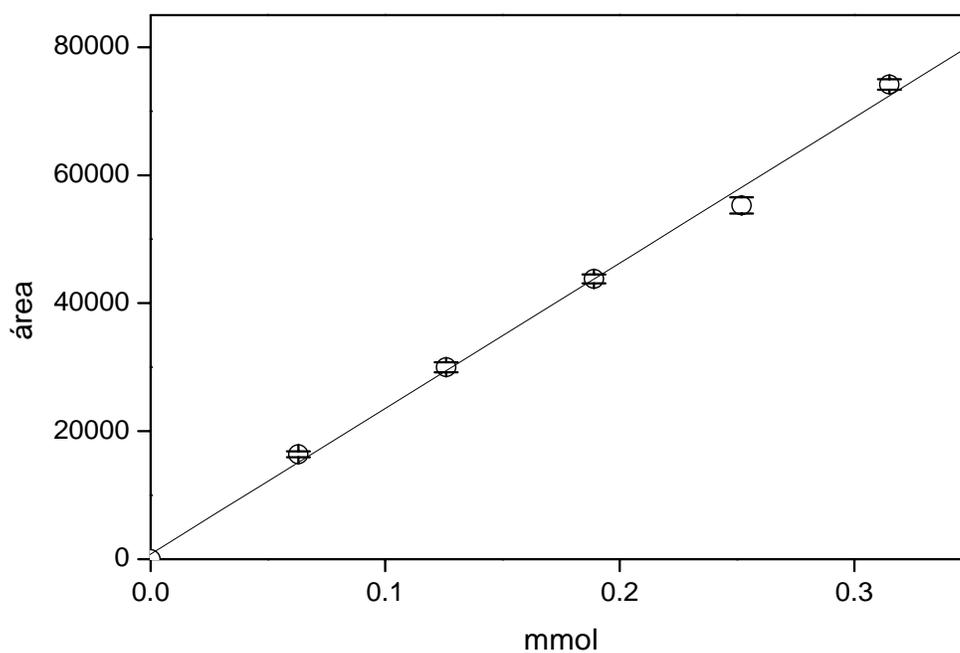
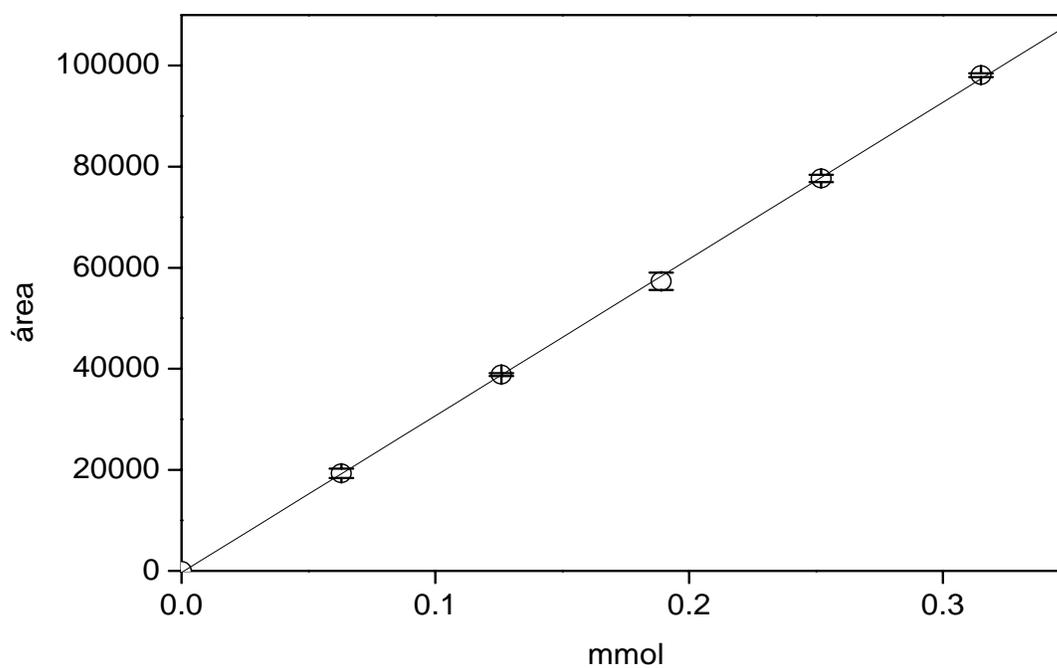
**Figura 8.6** Curva estándar de metano [$y = 227504 + 793.41x$; $R^2 = 0.9962$].

Tabla 8.4 Curva estándar de dióxido de carbono.

Volumen (L)	mmol	área
0	0	0
0.002	0.063	19314
0.004	0.126	38843.33
0.006	0.189	57309
0.008	0.252	77654.33
0.01	0.315	98092.5

**Figura 8.7** Curva estándar de dióxido de carbono [$y = 310351 - 317.98x$; $R^2 = 0.9998$].

Adendo.

7. CONCLUSIONES GENERALES

La saturación del doble enlace del ácido metacrílico y la subsecuente transformación a isobutírico, se lleva a cabo en las etapas fermentativas acidogénicas de la digestión anaerobia. Para este proceso se requiere un donador de electrones y dada la variedad microbiana y la asociación sintrófica de los consorcios anaerobios (no aclimatados), estos son capaces de proveerlos, ya que la degradación de este compuesto se lleva a cabo bajo estas condiciones aunque lentamente.

No se alcanzó la mineralización completa del compuesto tóxico adicionado aún en bajas concentraciones, debido a la formación de biopolímeros que son almacenados en las células y funcionan como reserva energética y de fuente de carbono, como el polihidroxibutirato. Sin embargo estos compuestos son de gran interés comercial debido a sus propiedades análogas a los polímeros derivados del petróleo, pero en contraste, completamente biodegradables.

De los ensayos en los que se encontró la formación de estos biopolímeros, se puede inferir que el ácido metacrílico actúa como inductor para la formación de este polímero, contrariamente a lo reportado, en donde la producción y el almacenamiento de estos compuestos esta asociado a condiciones de estrés ambiental.