



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

BIODEGRADACIÓN ANAEROBIA DE COMPUESTOS PETROQUÍMICOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA
P R E S E N T A
PATRICIA CASTILLA HERNÁNDEZ

COMITÉ TUTORIAL
DIRECTORA: DRA. MÓNICA A. MERAZ RODRÍGUEZ
ASESOR: DR. OSCAR A. MONROY HERMOSILLO
ASESOR: DR. ELÍAS RAZO FLORES

MÉXICO, D. F., JULIO 2006

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 142325 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y por el Instituto Mexicano del Petróleo mediante el proyecto FIES-98-90-VI.

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa está incluido en el Padrón Nacional de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Iztapalapa, D. F., a 21 de Julio del 2006

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

BIODEGRADACIÓN ANAEROBIA DE COMPUESTOS PETROQUÍMICOS

Que presentó

Patricia Castilla Hernández

Comité Tutorial

Dra. Mónica A. Meraz Rodríguez
Directora, UAM-Iztapalapa

Dr. Oscar A. Monroy Hermosillo
Asesor, UAM- Iztapalapa

Dr. Elías Razo Flores
Asesor, IPICyT-S. L. P.

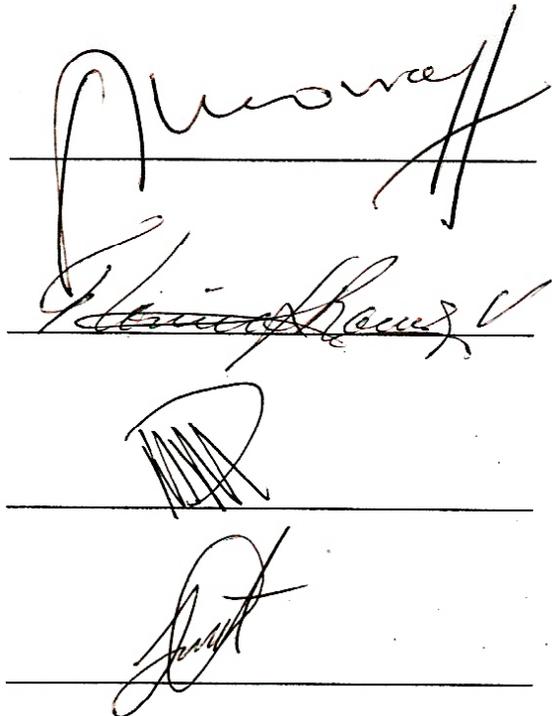
Jurado

Dr. Oscar A. Monroy Hermosillo
Presidente, UAM-Iztapalapa

Dra. Florina Ramírez Vives
Secretaria, UAM-Iztapalapa

Dr. Héctor M. Poggi Varaldo
Vocal, CINVESTAV-IPN

Dr. Francisco J. Almendariz Tapia
Vocal, Universidad de Sonora



The image shows four handwritten signatures, each written on a horizontal line. From top to bottom, the signatures correspond to the following individuals: Dr. Oscar A. Monroy Hermosillo (President), Dra. Florina Ramírez Vives (Secretary), Dr. Héctor M. Poggi Varaldo (Vocal), and Dr. Francisco J. Almendariz Tapia (Vocal). The signatures are written in black ink and are highly stylized.

CONTENIDO

Agradecimientos.	I
Lista de figuras	II
Lista de tablas.	IV
Notación.	VI
Resumen.	VIII
Abstract.	X
I. Introducción.	1
1. Marco de referencia.	2
2. Digestión anaerobia	3
2.1. Hidrólisis y acidogénesis.	3
2.2. Acetogénesis y homoacetogénesis.	5
2.3. Metanogénesis.	6
2.3.1. Metanogénesis acetoclástica.	7
2.3.2. Metanogénesis hidrogenotrófica.	8
3. Características químicas y degradación anaerobia de los compuestos estudiados.	11
3.1. Alcoholes.	11
3.1.1. Características químicas.	11
3.1.2. Degradación biológica.	13
3.1.2.1. Metanol.	13
3.1.2.2. Isopropanol (2-propanol).	14
3.1.2.3. Etilenglicol.	16
3.2. Ésteres del ácido acético.	17
3.2.1. Características químicas.	17
3.2.2. Degradación biológica.	18
3.2.2.1. Metil acetato.	18
3.2.2.2. Etil acetato.	19
3.2.2.3. Isopropil acetato.	19
3.2.2.4. Anhídrido acético.	19
3.3. Ésteres del ácido acrílico.	20
3.3.1. Características químicas.	20
3.3.2. Degradación biológica.	20
3.3.2.1. Ácido acrílico.	20
3.3.2.2. Metil acrilato y butil acrilato.	22
3.4. Hidrocarburos aromáticos: arenos.	23

3.4.1. Características químicas.	23
3.4.2. Degradación biológica.	24
3.4.2.1. <i>o, m, p</i> -Xileno.	24
3.4.2.2. Estireno.	25
4. Toxicidad de los compuestos químicos.	27
5. Justificación.	29
6. Hipótesis.	29
7. Objetivos.	30
7.1. Objetivo general.	30
7.2. Objetivos Particulares.	30
8. Metas.	30
II. Material y métodos.	32
1. Introducción.	33
2. Generales	33
2.1. Demanda química de oxígeno (DQO) teórica	33
2.2. Estimación del metano teórico	34
2.3. Medios de cultivo	34
2.4. Sólidos suspendidos volátiles.	36
3. Ensayos de biodegradación de alcoholes y ésteres en sistemas en lote	36
3.1. Compuestos probados por separado	36
3.2. Compuestos probados en mezcla	36
3.3. Preparación de los sistemas en lote	37
3.4. Tratamiento de las muestras.	38
3.5. Determinación de sustratos	38
3.6. Producción de metano	41
3.7. Pruebas de toxicidad de las mezclas de compuestos.	42
3.8. Balances.	42
3.9. Velocidad específica de consumo de sustrato y/o producción de metano.	43
4. Pruebas para evaluar la degradación de la mezcla de compuestos en un sistema continuo.	43
4.1. Reactor.	43
4.2. Adaptación del lodo a los 14 compuestos.. . . .	44
4.2.1. Alimentación del reactor.	45
4.2.2. Bioensayos de degradabilidad.	46
4.3. Aumento de la carga orgánica volumétrica (B_v) con disminución del TRH.	46
4.4. Parámetros monitoreados.	46

4.4.1. Demanda química de oxígeno (DQO).	46
4.4.2. pH.	47
4.4.3. Relación de alcalinidades	47
4.4.4. Biogás, cantidad y composición.	48
4.4.5. Determinación de los xilenos.	49
4.4.6. Determinación de metano en las pruebas de degradación de los xilenos.	49
4.4.7. Determinación de los compuestos en el efluente del reactor a un TRH de 4 y 3 h.	50
4.4.8. Parámetros de operación del reactor.	51
5. Pruebas para determinar la biodegradabilidad del ácido acrílico con alcoholes.	52
5.1. Alcoholes probados en lote.	52
5.2. Determinación de sustratos, intermediarios y productos.	53
5.3. Alcoholes probados en experimentos en continuo	53
5.3.1. Reactores.	53
5.3.2. Alimentación de los reactores.	53
5.3.3. Parámetros monitoreados.	54
5.3.4. Identificación de compuestos formados en el reactor RE.	55
III. Biodegradación de alcoholes y ésteres en lote.	56
1. Antecedentes.	57
2. Resultados y discusión.	59
2.1. Biodegradación de compuestos por separado.	59
2.2. Biodegradación de mezclas.	64
2.3. Comparación de la biodegradabilidad entre alcoholes, ésteres acéticos y ésteres acrílicos	71
2.4. Toxicidad de la mezcla de compuestos sobre la metanogénesis acetoclástica.	74
3. Conclusiones.	77
IV. Degradación en continuo de la mezcla de compuestos.	79
1. Antecedentes.	80
2. Resultados y discusión	82
2.1. Adaptación del lodo del reactor a los 14 compuestos.	82
2.2. Incremento de la carga orgánica volumétrica.	87
3. Conclusiones.	90
V. Biodegradación de ácido acrílico: Efecto de la adición de alcoholes.	92
1. Antecedentes.	93

2. Resultados y discusión.	95
2.1. Biodegradación en lote de ácido acrílico en presencia de alcoholes .	95
2.2. Degradación de ácido acrílico con	
alcoholes en reactores continuos	99
2.2.1. Reactor control (RC)	99
2.2.2. Reactor con metanol (RM)	101
2.2.3. Reactor con etanol (RE)	101
2.2.4. Reactor alimentado con butanol (RB)	104
2.2.5. Comparación de la degradación del ácido acrílico	
y alcoholes en reactores continuos.	104
3. Conclusiones.	109
VI. Conclusiones generales y recomendaciones.	111
1. Conclusiones generales.	112
2. Recomendaciones.	114
VII. Referencias bibliográficas.	115
Publicación relacionada con la tesis.	122

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Mónica Meraz Rodríguez, por la dirección de este trabajo, por compartir su experiencia y sobre todo por su amistad.

Al Dr. Oscar Monroy Hermosillo, por su relevante y valiosa asesoría, por que a pesar de sus múltiples ocupaciones siempre tuvo tiempo para resolver mis dudas. Gracias por su amistad.

Al Dr. Elías Razo Flores, por su asesoría y por hacerme reflexionar acerca de las metas de este trabajo.

A la M. en B. Carmen Fajardo Ortiz, por formar parte del Comité Tutorial durante el primer nivel del Posgrado. Por todas las horas de asesoría dedicadas al desarrollo de las técnicas cromatográficas. Sin tu experiencia, paciencia y entusiasmo esto no hubiera sido posible.

A los miembros del Jurado, Dr. Héctor M. Poggi Varaldo, Dra. Florina Ramírez Vives y Dr. Francisco J. Almendariz Tapia, por sus valiosos comentarios y por la oportuna revisión de la tesis.

A mis compañeros y amigos del laboratorio (W-106), Maricela, Sergio, Angélica, Lourdes, Javier, Santiago, Andrea, Rosa, Daniel, Miriam, Gehovana, Ulises García, Xitlalli, Ulises Durán, Edgar, Margarita, Huizache, Alejandro, Jesús, Zhenia y Mónica. Gracias por todos los momentos que compartimos juntos dentro y fuera del laboratorio.

A Lucía Hernández y Alfonso Castilla, por enseñarme a ser perseverante.

A Benito Carmona, por apoyarme en todo momento en el afán de alcanzar mis metas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Etapas que siguen los compuestos contaminantes al ser degradados por digestión anaerobia.	5
Figura 1.2. Reacciones que ocurren en la vía del Acetil CoA para la síntesis de acetato.	7
Figura 1.3. Ruta de conversión del acetato hasta CO ₂ y CH ₄	8
Figura 1.4. Bioquímica de la reducción de CO ₂ hasta metano	9
Figura 1.5. Vías involucradas en la degradación de metanol a metano.	14
Figura 1.6. Ruta de degradación del etilenglicol.	17
Figura 1.7. Degradación de lactato hasta acetato, propionato y CO ₂ , probablemente similar a la seguida para la fermentación de acrilato.	21
Figura 1.8. Adición de fumarato al grupo metilo del <i>meta</i> -xileno para formar metilbencilsuccinato.	25
Figura 1.9. Vía de degradación de estireno seguida por un consorcio anaerobio metanogénico.	26
Figura 2.1. Panorama general del procedimiento experimental utilizado en este trabajo.	33
Figura 2.2. Resolución y tiempos de retención de los diferentes compuestos e intermediarios que integran cada una de las mezclas.	40
Figura 2.3. Sistema de medición de metano.	41
Figura 2.4. Diagrama del reactor UASB.	44
Figura 2.5. Cromatograma de los compuestos identificados en el efluente del reactor a 4 y 3 horas de TRH.	51
Figuras 3.1a y b. Descomposición consecutiva de ME con formación de metanol y acetato como intermediarios.	59
Figuras 3.2a y b. Degradación consecutiva de isopropil acetato a metano con intermediarios como acetato, isopropanol y acetona.	60
Figuras 3.3a, b y c. Degradación consecutiva de metil acrilato en diversos intermediarios y producción de metano.	62
Figuras 3.4a, b y c. Hidrólisis de BA, formación de intermediarios y producción de metano.	63
Figuras 3.5a, b y c. Alcoholes probados en mezcla; hidrólisis, formación de intermediarios y producción de metano.	65
Figuras 3.6a, b y c. Perfil de consumo de la mezcla de ésteres del ácido acético, subproductos y productos formados.	67
Figuras 3.7a, b y c. Hidrólisis de la mezcla de ésteres del ácido acrílico, formación de intermediarios y producción de metano.	69

Figura 3.8. Patrón de consumo de las mezclas de ésteres del ácido acético, ésteres del ácido acrílico y alcoholes. Evolución de la producción de metano. . . .	73
Figura 3.9. Concentración de la mezcla de alcoholes a la que se inhibió el 50% de la actividad metanogénica acetoclástica.	75
Figura 3.10. Concentración de la mezcla de ésteres del ácido acético a la que se inhibió el 50% de la actividad metanogénica acetoclástica.	75
Figura 3.11. Concentración de la mezcla de ésteres del ácido acrílico a la que se inhibió el 50% de la actividad metanogénica acetoclástica.	76
Figura 4.1. Desempeño del reactor durante la adición de cada uno de los compuestos.	82
Figura 4.2. Evolución de la relación de alcalinidades durante la aclimatación a los compuestos.	83
Figuras 4.3. Degradación de ácido acrílico con lodo no adaptado y lodo adaptado en el reactor.	84
Figura 4.4. Patrón de degradación de xilenos y producción de metano.	86
Figura 4.5. Evolución del metano durante las diferentes etapas de aclimatación a los compuestos.	87
Figura 4.6. Comportamiento del reactor durante el aumento de la carga orgánica volumétrica por la disminución del TRH y DQO residual.	88
Figura 4.7. Disminución de la eficiencia de remoción promedio durante el aumento de la carga orgánica volumétrica y producción de metano.	89
Figura 4.8. Compuestos químicos detectados en el efluente del reactor a 4 y 3 horas de TRH.	89
Figura 4.9. Evolución del metano cuando el reactor se operó a distintos TRH.	90
Figura 5.1. Degradación de ácido acrílico en presencia de los alcoholes y consumo de los alcoholes.	96
Figura 5.2. Intermediarios formados a partir de la degradación del ácido acrílico y de los alcoholes.	97
Figura 5.3. Producción de metano a partir de la degradación de ácido acrílico y de los alcoholes.	98
Figura 5.4. Reactor RC: degradación de ácido acrílico sin adición de alcoholes.	100
Figura 5.5. Reactor RM: degradación del ácido acrílico con metanol.	102
Figura 5.6. Reactor RE: degradación de ácido acrílico con etanol.	103
Figura 5.7. RB: degradación de ácido acrílico con butanol.	105

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1. Clasificación de los compuestos petroquímicos según su estructura química.	4
Tabla 1.2. Reacciones involucradas en cada una de las etapas de la digestión anaerobia.	10
Tabla 1.3. Propiedades físico-químicas de los compuestos estudiados.	12
Tabla 1.4. Reacciones involucradas en la digestión anaerobia de varios compuestos químicos orgánicos.	15
Tabla 1.5. Toxicidad de los compuestos petroquímicos en humanos, peces, crustáceos y algas.	27
Tabla 2.1. Demanda química de oxígeno equivalente de los compuestos.	34
Tabla 2.2. Medio de cultivo de Balch.	35
Tabla 2.3. Medio de cultivo de Visser.	35
Tabla 2.4. Concentración inicial para los compuestos probados por separado.	36
Tabla 2.5. Concentración inicial de los compuestos probados en mezcla.	37
Tabla 2.6. Condiciones de operación del cromatógrafo de gases y parámetros obtenidos para la determinación de sustratos e intermediarios.	39
Tabla 2.7. Estrategia de alimentación en cada una de las etapas en el reactor UASB.	45
Tabla 2.8. Proporciones de CH ₄ y CO ₂	48
Tabla 2.9. Condiciones de separación del xileno y sus isómeros.	49
Tabla 2.10. Parámetros para la determinación de cada uno de los compuestos presentes en el efluente del reactor a 4 y 3 h de TRH.	50
Tabla 2.11. Alimentación con ácido acrílico más el respectivo alcohol.	52
Tabla 2.12. Condiciones de separación de los sustratos e intermediarios y parámetros obtenidos.	54
Tabla 3.1. Comparación de la velocidad específica de consumo o hidrólisis entre compuestos correspondientes a cada mezcla.	66
Tabla 3.2. Sustratos alimentados, relación másica inicial, velocidad específica de consumo y/o hidrólisis de sustratos,intermediarios producidos y velocidad específica de producción de metano, en ensayos separados y mezclas.	72
Tabla 3.3. Concentraciones iniciales en ensayos de biodegradación de mezclas de compuestos y concentración inhibitoria (CI ₅₀).	77
Tabla 4.1. Velocidad de transformación y mineralización del xileno y sus isómeros en ensayos en lote.	86
Tabla 5.1. Reacciones involucradas en la degradación de diversos alcoholes.	95
Tabla 5.2. Velocidades específicas de consumo de sustrato y producción de metano.	96

Tabla 5.3. Comparación del comportamiento de los cuatro reactores
degradando ácido acrílico y alcoholes. 107

NOTACIÓN

AA	Ácido acrílico
AE	Anhídrido acético
BA	Butil acrilato
B_v	Carga orgánica volumétrica
CI₅₀	Concentración de tóxico que reduce la actividad metanogénica en un 50%
DQO	Demanda química de oxígeno
DQO-CH₄	Metano equivalente en DQO
EE	Etil acetato
EH	Etanol
GH	Etilenglicol
IE	Isopropil acetato
IH	Isopropanol
MA	Metil acrilato
ME	Metil acetato
MH	Metanol
MX	<i>m</i> -Xileno
OX	<i>o</i> -Xileno
PX	<i>p</i> -Xileno
r_{AC}	Reacción acetato a metano
r_{ACE}	Reacción acetona a acetato
r_{ACEM}	Reacción acetona a metano
r_{ACR}	Reacción ácido acrílico a acetato y propionato
RB	Reactor butanol
r_{BA}	Hidrólisis butil acrilato
r_{BUH}	Reacción butanol a butirato
r_{BUT}	Reacción butirato a acetato
RC	Reactor control
RE	Reactor etanol
r_{EE}	Hidrólisis etil acetato
r_{ETH}	Reacción etanol a acetato
r_{GH}	Reacción etilenglicol a etanol y acetato
r_{H2}	Reacción H ₂ y CO ₂ a metano
r_{IE}	Reacción hidrólisis isopropil acetato
r_{IH}	Reacción isopropanol a acetona
RM	Reactor metanol
r_{MA}	Reacción hidrólisis metil acrilato
r_{ME}	Reacción hidrólisis metil acetato
r_{MHA}	Reacción metanol a acetato
r_{MHH}	Reacción metanol a H ₂ y CO ₂
r_{PR}	Reacción propionato a acetato
SSV	Sólidos suspendidos volátiles

ST	Estireno
TR	Tiempo de retención
TRH	Tiempo de retención hidráulico
V_{EC/H}	Velocidad específica de consumo y/o hidrólisis del sustrato
V_{Esp CH₄}	Velocidad específica de producción de metano o actividad metanogénica específica

Castilla Hernández Patricia (2006). Biodegradación anaerobia de compuestos petroquímicos. Resumen de Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México.**Resumen**

Una de las principales fuentes de contaminación marina es la causada por hidrocarburos, donde la transportación de petróleo no refinado tiene una pequeña contribución. No obstante, la mayor aportación se debe a operaciones rutinarias realizadas por buques de carga; entre las que se encuentra el vertido de aguas de lavado de tanques o contenedores empleados en la transportación de compuestos petroquímicos, las que son desechadas al mar sin ser previamente tratadas. En este trabajo se evaluó la biodegradación anaerobia de compuestos petroquímicos presentes en aguas de lavado, entre los que se encuentran alcoholes (metanol, etilenglicol e isopropanol), ésteres del ácido acético (acetato de metilo, etilo e isopropilo y anhídrido acético), ácido acrílico y sus ésteres metil y butil acrilato y aromáticos (*o-m-p*-xileno y estireno).

En primer lugar en sistemas en lote se determinó la biodegradabilidad por separado de metil e isopropil acetato y metil y butil acrilato. Evaluando también el nivel de degradación y el índice de toxicidad (CI_{50}) de las mezclas de compuestos agrupados como alcoholes, ésteres del ácido acético y ésteres del ácido acrílico. En los compuestos probados por separado la velocidad de hidrólisis fue mayor para el metil e isopropil acetato (0.051 y 0.049 $gDQO \cdot gSSV^{-1} \cdot d^{-1}$) en comparación con metil y butil acrilato (0.014 y 0.032 $gDQO \cdot gSSV^{-1} \cdot d^{-1}$). El metano producido fue del 87, 32, 11 y 5%, respectivamente. En las mezclas, las velocidades de hidrólisis para los ésteres del ácido acrílico, ésteres del ácido acético y alcoholes fueron de 0.039 , 0.032 y 0.023 $gDQO \cdot gSSV^{-1} \cdot d^{-1}$ y los niveles de mineralización de 54, 93 y 91%, respectivamente. De acuerdo al seguimiento de los sustratos e intermediarios formados, se encontró que la presencia de ácido acrílico disminuyó la velocidad de hidrólisis de sus ésteres, afectando negativamente la producción de metano ya que causó un efecto tóxico sobre las bacterias consumidoras de acetato y propionato. Mientras que el isopropanol y su intermediario acetona evitaron que las mezclas de ésteres del ácido acético y alcoholes se degradaran completamente. La CI_{50} encontrada para las mezclas de alcoholes, ésteres del ácido acético y ésteres del ácido acrílico fue de 16, 19 y 0.25 $gDQO \cdot L^{-1}$.

Por otra parte en un reactor UASB se evaluó la degradación de la mezcla de los catorce compuestos alimentados a baja concentración y se determinó el efecto del incremento de la carga orgánica volumétrica (B_v) de la mezcla sobre la eficiencia de remoción, determinando los compuestos que no se degradaron a las B_v más altas. Los compuestos se adicionaron al reactor uno a uno hasta alcanzar la mezcla compleja, de estos el isopropanol y el ácido acrílico provocaron una disminución de la eficiencia de remoción hasta un 60% y 83% respectivamente, requiriendo alrededor de 40 días para su recuperación. El metil acrilato y etilenglicol llevaron al reactor a periodos cortos de inestabilidad y cuando los sustratos restantes se alimentaron permaneció estable. Con la mezcla de los catorce compuestos la eficiencia de remoción promedio fue alrededor del 95% y el metano producido alcanzó un 84%. Al incrementar la B_v a 2.3, 3.2, 3.6, 4.8 y 6.5 $gDQO \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ las eficiencias de remoción

disminuyeron en promedio hasta un 93, 87, 84, 79 y 74%. En las últimas dos B_v sólo los alcoholes se degradaron completamente.

Finalmente se evaluó el efecto de metanol, etanol, etilenglicol, isopropanol y butanol sobre la degradación de ácido acrílico y a su vez se determinó el efecto del ácido acrílico sobre la degradación de estos alcoholes. Los resultados mostraron que aunque algunos alcoholes favorecieron la velocidad específica de consumo del ácido acrílico, como el etanol y butanol, esto no eliminó el efecto tóxico sobre las bacterias metanogénicas acetoclásticas aunque lo disminuyó ligeramente, caso contrario a las bacterias consumidoras de propionato sobre quienes los alcoholes acentuaron la toxicidad. Se encontró que el ácido acrílico es tóxico a bacterias acetogénicas consumidoras de etanol, afectando ligeramente a las consumidoras de butirato, pero no causó un efecto negativo sobre las bacterias metilotrofas consumidoras de metanol y bacterias que oxidan el butanol.

Castilla Hernández Patricia (2006). Anaerobic biodegradation of petrochemicals compounds. Doctoral Thesis Abstract. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Mexico.**Abstract**

One of the main source of marine pollution is that caused by hydrocarbons, from this, oil transportation spills has a small contribution. The main contribution is due to daily operations carried out by cargo ships; between them tanks and containers washing operations that are discarded without treatment during petrochemical compounds transportation.

In this work the anaerobic biodegradation of petrochemical compounds from washing wastewaters, such as alcohols (methanol, ethylene glycol and isopropanol), acetic acid esters (methyl, ethyl, isopropyl acetate, acetic anhydride) acrylic acid esters (methyl and butyl acrylate) and aromatics (*o-m-p*-xylene y styrene).

Firstly, methyl and isopropyl acetate besides methyl and butyl acrylate biodegradability separately was tested in batch systems. As well as the degradation level and IC₅₀ concentration of these chemicals mixed by chemical structure similarity.

The hydrolysis rate was higher for methyl and isopropyl acetate (0.051 y 0.049 gCOD·gVSS⁻¹·d⁻¹) compared to methyl and butyl acrylate (0.014 y 0.032 gCOD·gVSS⁻¹·d⁻¹), while methane produced was 87, 32, 11 y 5%, respectively. In mixtures, hydrolysis rates for acrylic acid esters, acetic acid esters and alcohols were de 0.039, 0.032 y 0.023 gCOD·gVSS⁻¹·d⁻¹ and methanization levels of 54, 93 y 91%, respectively. Accordingly to substrates and intermediaries formed, acrylic acid presence diminished the hydrolysis rate of its esters, affecting negativally methane production, since it caused a toxic effect on acetoclastic and propionoclastic bacteria. While isopropanol and its intermediary ketone prevented that acetic acid esters and alcohols mixtures to be completely broken down. IC₅₀ values found for alcohols mixtures, acetic acid and acrylic acid were 16, 19 y 0.25 gCOD·L⁻¹.

In the other hand, biodegradability of all chemicals mixed together was evaluated in a UASB reactor fed at low concentration level (mass ratio of 0.1 gCOD·gVSS⁻¹), the increase in organic loading rate (B_v) was determined on removal efficiency and some chemicals were not degraded at high HRT. The chemicals were added one by one to make up a complex mixture, from them isopropanol and acrylic acid led to a removal efficiency diminution to 60% y 83% respectively, requiring around 40 days for its recovery. Methyl acrylate and ethylenglycol addition led the reactor short instability periods while with the addition of the rest of the chemicals the reactor remained stable. Mean removal efficiency was around 95% when all chemicals were added, and methane production reached 84%. When B_v increased to 2.3, 3.2, 3.6, 4.8 y 6.5 gCOD·L⁻¹·d⁻¹ removal efficiencies diminished to 93, 87, 84, 79 y 74%. For the two higher loading rates, only alcohols were completely removed.

Finally, the effect of methanol, ethanol, ethylene glycol, isopropanol and butanol on acrylic acid degradation was tested, and at the contrary, the effect of acrylic acid on the biodegradation of these alcohols was determined. Results showed that although some of the alcohols like ethanol and butanol, favored the acrylic acid consumption specific rate, the toxic effect on methanogenic acetoclastic bacteria was not eliminated but only slightly

diminished. The contrary resulted in the case of propionoclastic bacteria, where the toxic effect toxicity was increased. It was found that acrylic acid was toxic to ethanol fermenting acetogenic bacteria, affecting slightly to butyrate consumers and without any effect on methylotrophic and butanol oxidizing bacteria.

I. INTRODUCCIÓN

1. Marco de referencia

Las aguas de origen doméstico, industrial y por hidrocarburos son las principales fuentes de contaminación marina. Las dos primeras se generan en tierra y representan el 50% de ésta. La tercera generalmente se asocia a derrames accidentales de buques petroleros, dado que de 2000 millones de toneladas de productos petrolíferos que se transportan vía marítima anualmente en el mundo, el 80% corresponden a petróleo crudo; no obstante, sólo representa el 5%. Mientras que otro 19% se genera a partir de operaciones rutinarias realizadas por buques de carga como son vertidos de agua de salas de bombas y máquinas, eliminación de residuos de carga, derrames accidentales durante operaciones de carga, descarga y trasvase, así como lavado de tanques (Medio Ambiente en Andalucía, 2000).

Considerando todas las fuentes de contaminación, anualmente ingresan al mar alrededor de 6,500,000 toneladas de hidrocarburos, la mitad causada por los buques transportadores (Siciliano, 2002). En México en el año 2005 se recolectaron 30 mil 551 toneladas de desechos del mar, de éstas 117 fueron ocasionadas por derrames de hidrocarburos y sustancias nocivas. También se recolectaron 3 millones mil litros de líquidos contaminantes, de los que, 1,666, 440 contenían hidrocarburos (Medellín, 2006).

Además de la contaminación producida por el transporte de petróleo no refinado, existen una gran variedad de productos químicos transportados por mar. Se calcula que de todas las mercancías transportadas alrededor del 35% corresponden a productos químicos peligrosos transportados en buques tanque (Siciliano, 2000).

Específicamente de la reformación de hidrocarburos básicos del petróleo como las olefinas ligeras (etileno, propileno y butenos), aromáticos y gas natural, se obtienen productos químicos entre los que se encuentran el metanol, el isopropanol, el etilenglicol, los acetatos de metilo, etilo e isopropilo, el anhídrido acético, el ácido acrílico, los acrilatos de metilo y butilo, el estireno y el xileno que son embalados en contenedores y transportados por esta vía. Una vez en los lugares de destino, las sustancias químicas son vaciadas y posteriormente los contenedores son lavados, desechando el agua al mar sin un tratamiento previo. Estos compuestos son transportados a las industrias según su requerimiento, por lo que las aguas de desecho pueden contener mezclas variadas de todos ellos. Debido a su alto

valor agregado y que provienen de aguas de lavado las concentraciones de estos compuestos en aguas de desecho son bajas.

La legislación ambiental en México, en la NOM-052-SEMARNAT-2005 clasifica a la mayoría de estos compuestos como residuos peligrosos por su toxicidad al ambiente. Esta situación obliga al sector industrial y del transporte marítimo a la búsqueda de procesos, a través de la investigación, que sean adecuados para el tratamiento de las aguas generadas del lavado de contenedores de compuestos petroquímicos.

Se ha reportado que algunos de estos compuestos pueden ser tratados por digestión anaerobia, dado que al hidrolizarse o fermentarse producen intermediarios que pueden ser transformados hasta CH_4 y CO_2 .

Por lo que en este trabajo se evaluó la biodegradación anaerobia de catorce compuestos químicos clasificados de acuerdo a su estructura química como alcoholes (metanol, isopropanol y etilenglicol), ésteres del ácido acético (metil, etil e isopropil acetato y anhídrido acético), ésteres del ácido acrílico (ácido acrílico, metil y butil acrilato) y aromáticos (*o-m-p*-xileno y estireno) ver Tabla 1.1.

2. Digestión anaerobia

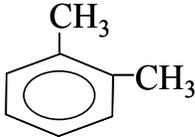
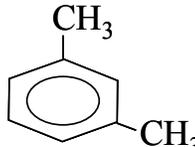
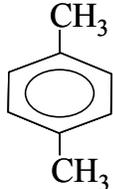
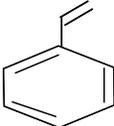
La digestión anaerobia es un proceso en el que la materia orgánica en ausencia de oxígeno, es transformada a través de una serie de reacciones hasta los productos finales metano y dióxido de carbono, obteniendo un bajo rendimiento en biomasa. Alrededor del 90% de la energía viable en el sustrato es retenida como CH_4 . Durante la digestión anaerobia los consorcios microbianos activos realizan un proceso complejo que involucra varios pasos intermedios definidos como hidrólisis-acidogénesis, acetogénesis-homoacetogénesis y metanogénesis (Figura 1.1).

2.1. Hidrólisis y acidogénesis

Si los sustratos consisten de compuestos orgánicos complejos como proteínas, carbohidratos, lípidos, bases púricas y compuestos aromáticos, deben ser primeramente hidrolizados a compuestos orgánicos simples, este proceso es catalizado por enzimas

extracelulares excretadas por bacterias acidogénicas (Speece, 1996; Kleerebezem y Macarie, 2003).

Tabla 1.1. Clasificación de los compuestos petroquímicos según su estructura química.

Clasificación	Estructuras químicas			
Alcoholes	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{CHCH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2-\text{OH} \end{array}$	
	Metanol	Isopropanol	Etilenglicol	
Ésteres del ácido acético	$\begin{array}{c} \text{O} \\ // \\ \text{CH}_3-\text{C} \\ \backslash \\ \text{OCH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ // \\ \text{CH}_3-\text{C} \\ \backslash \\ \text{OC}_2\text{H}_5 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{CH}_3 \\ // \quad \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{O}-\text{CH} \\ \quad \quad \\ \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ // \\ \text{CH}_3-\text{C} \\ \backslash \\ \text{O} \\ \text{CH}_3-\text{C} \\ // \\ \text{O} \end{array}$
	Metil acetato	Etil acetato	Isopropil acetato	Anhídrido acético
Ésteres del ácido acrílico	$\text{CH}_2=\text{CHCOOH}$	$\text{CH}_2=\text{CHCOOCH}_3$	$\text{CH}_2=\text{CHCOOC}_4\text{H}_9$	
	Ácido acrílico	Metil acrilato	Butil acrilato	
Aromáticos				
	<i>orto</i> -xileno	<i>meta</i> -xileno	<i>para</i> -xileno	Estireno

En estos ambientes anaerobios no existe un suministro adecuado de aceptores de electrones como SO_4^{-2} , NO_3^- , Fe^{3+} entre otros, por lo que las bacterias acidogénicas fermentan los compuestos simples como azúcares, aminoácidos y péptidos a alcoholes,

ácidos orgánicos volátiles como el ácido acético, propiónico, butírico, láctico, valérico, ácido fórmico, etc., produciendo H_2 y CO_2 (Madigan *et al.*, 2004; Speece, 1996). Entre los géneros representativos involucrados en la hidrólisis y acidogénesis se encuentran *Clostridium*, *Proteus*, *Streptococcus*, *Eubacterium*, *Butyrovibrio*, *Propionibacterium*, *Raminococcus*, *Acetovirium celluloliticus*.

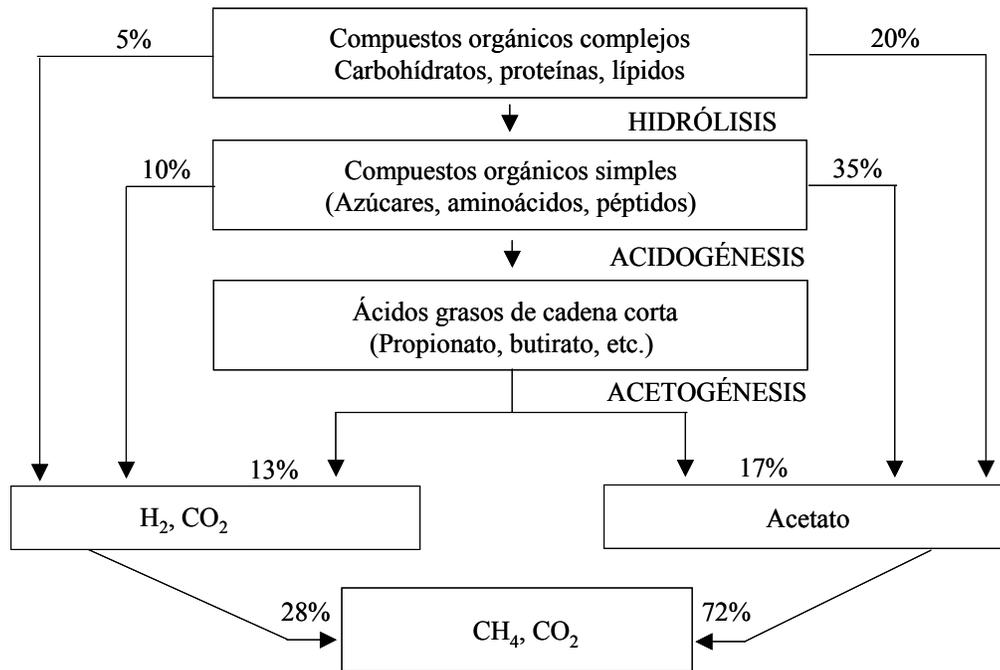
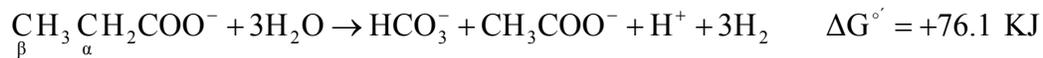
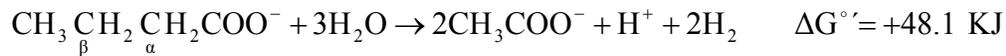


Figura 1.1. Etapas que siguen los compuestos contaminantes al ser degradados por digestión anaerobia (Speece, 1996).

2.2. Acetogénesis y homoacetogénesis

Los compuestos provenientes de la fermentación son transformados hasta acetato (*acetogénesis*), CO_2 e H_2 por bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno (OHPA), tales como *Syntrophobacter wolinii*, *Syntrophomonas wolfei*, *Syntrophomonas bryantii*, etc. McInerney *et al.* (1981), reportan que la oxidación anaerobia de ácidos grasos de cadena larga es realizada por *S. wolfei* mediante la β -oxidación. A través de este mecanismo la longitud de la cadena va disminuyendo, cuando los ácidos tienen números de carbonos pares darán como producto acetato, si el número es impar resultarán en propionato y acetato; cuando existe una ramificación esta es mantenida en el ácido producido. Sin embargo como se observa en las siguientes reacciones muchas de ellas no son espontáneas.



Por lo que, para que estas reacciones sean favorables se requiere que el hidrógeno producido durante la acidogénesis y acetogénesis sea utilizado, ya que las bacterias OHPA son inhibidas por este producto. Monroy (1998) reporta que las reacciones oxidativas del propionato y butirato respectivamente, se vuelven exergónicas a presiones parciales de hidrógeno menores a 10^{-4} y 10^{-3} atm. Estas presiones se alcanzan por el consumo de hidrógeno que se da a través de la sintrofia con bacterias metanogénicas hidrogenotrofas, que lo utilizan durante la reducción de CO_2 a metano. Los ácidos grasos de cadena larga mayores a cuatro carbonos se metabolizan lentamente y en determinadas condiciones pueden ser tóxicos debido a su baja solubilidad (Soubes, 1994).

Por otro lado, una fracción de H_2 es utilizada como donador de electrones para reducir CO_2 hasta acetato (*homoacetogénesis*) de acuerdo a la vía del Acetil-Co-A (Figura 1.2). Esta es llevada a cabo por organismos homoacetogénicos como *Clostridium formicoaceticum*, *Acetobacterium woodii*, etc.

Esta reducción es realizada a través de dos rutas que ocurren simultáneamente (Figura 1.2), en la primera una molécula de CO_2 es reducida para formar el grupo metilo del acetato, en la segunda, otra molécula de CO_2 es reducida formando el grupo carbonilo, ambas seguidas de un ensamblaje con la formación de acetil-CoA que finalmente es oxidada hasta acetato (Madigan *et al.*, 2004). Todas estas reacciones son catalizadas por diferentes enzimas como se observa en la Figura 1.2.

2.3. Metanogénesis

Finalmente productos como el H_2 , CO_2 y acetato, son transformados por bacterias metanogénicas hasta CH_4 y CO_2 . Las bacterias metanogénicas son anaerobias estrictas y pertenecen a las *Arqueobacterias*, estas presentan algunas diferencias estructurales con respecto a las bacterias verdaderas, como la pared celular que puede estar formada por un pseudopeptidoglicano, polisacáridos, glicoproteínas o proteínas. Su membrana posee

cadena lateral formada por unidades repetitivas de una molécula de isopreno, en lugar de ácidos grasos. También presentan secuencias distintivas en su RNA ribosomal.

El proceso de metanización es llevado a cabo por dos vías diferentes dependiendo de los sustratos.

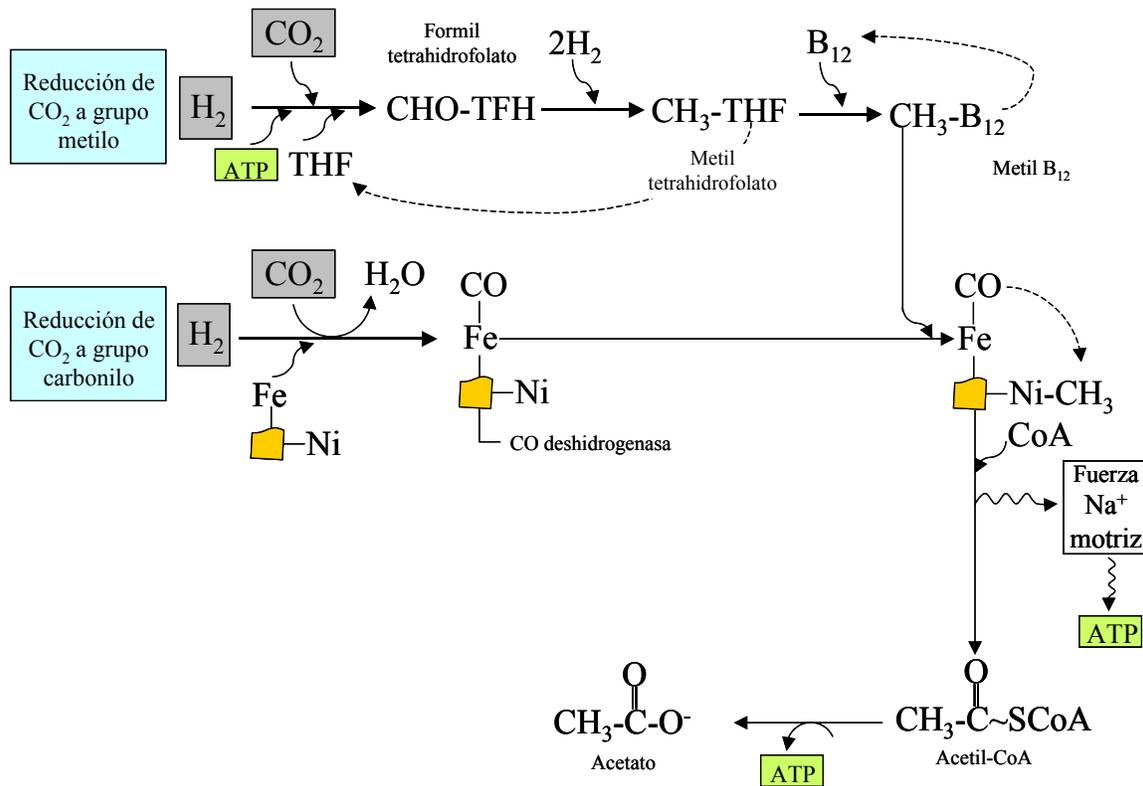


Figura 1.2. Reacciones que ocurren en la vía del Acetil CoA para la síntesis de acetato (Madigan *et al.*, 2004).

2.3.1. Metanogénesis acetoclástica

En la metanogénesis acetoclástica el acetato es reducido hasta metano y bióxido de carbono; aparentemente esta reducción está limitada al género *Methanosarcina*, entre las que se encuentran *M. barkeri*, *M. mazei*, *M. thermophila*, etc., y al género *Methanotrix* actualmente conocido como *Methanosaeta* (Thauer *et al.*, 1989). Durante este proceso (Figura 1.3) el acetato es activado a acetil-CoA, seguido de un rompimiento de los enlaces carbono-carbono y carbono sulfuro, que es catalizado por el complejo enzimático monóxido de carbono deshidrogenasa (CODH). Posteriormente el componente níquel/ion-sulfuro del complejo oxida el grupo carbonilo hasta CO_2 reduciendo una ferredoxina. Mientras que el

involucradas en este proceso se pueden mencionar a *Methanobacterium formicum*, *Methanospirillum hungatei*, *Methanobrevibacter sp.*, etc.

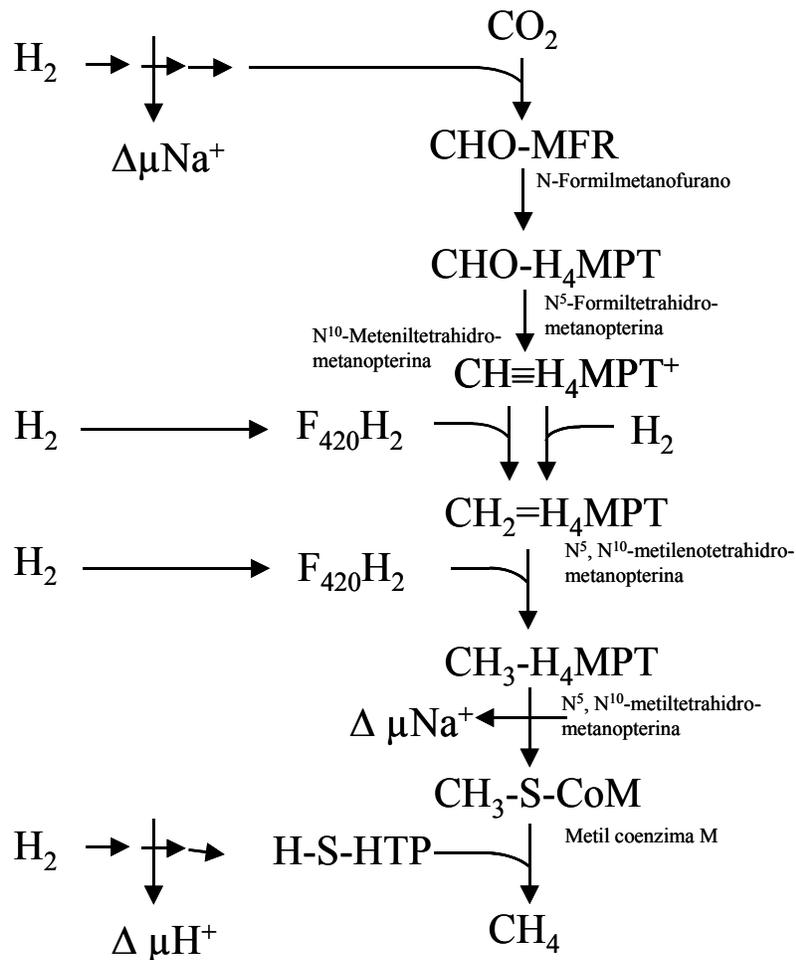


Figura 1.4. Bioquímica de la reducción de CO_2 hasta metano (Thauer, 1993).

En esta vía el primer paso corresponde a la activación del CO_2 a N-formilmetanofurano, que a su vez es transferido a una enzima que contiene metanopterina, posteriormente es deshidratado formando metileno y reducido dando un metilo, este grupo metilo es transferido de la metanopterina a la CoM, finalmente el metil-CoM es reducido a metano catalizado por una metil reductasa.

Por otra parte algunas bacterias metanogénicas también pueden utilizar otros sustratos como las metilaminas o el metanol, las vía que sigue este último durante su degradación será descrita más adelante.

En la Tabla 1.2 se presentan las principales reacciones estequiométricas involucradas en cada una de las etapas de la digestión anaerobia descritas anteriormente.

Tabla 1.2. Reacciones involucradas en cada una de las etapas de la digestión anaerobia.

Reacciones	$\Delta G^{\circ'a}$ (kJ/mol)	Referencia
Hidrólisis y acidogénesis		
$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + 2H^+ + 2CO_2 + 4H_2$	-215	Thauer (1998)
$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COO^- + 2H_2O + 2H^+$	-358.1	Pipyn y Verstraete (1981)
$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3CH_2CH_2COO^- + 2HCO_3^- + 3H^+ + 2H_2$	-254.6	Pipyn y Verstraete (1981)
$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2HCO_3^- + 2H^+$	-225.9	Pipyn y Verstraete (1981)
Acetogénesis y homoacetogénesis		
$CH_3CH_2COO^- + 3H_2O \rightarrow CH_3COO^- + HCO_3^- + 3H_2 + H^+$	+76	Stams y Plugge (1994)
$CH_3CH_2CH_2COO^- + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$	+48.1	Pipyn y Verstraete (1981)
$2CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + 2H_2O$	-95	Tahuer <i>et al.</i> (1989)
Metanogénesis acetoclástica e hidrogenotrófica		
$CH_3COO^- + H^+ \rightarrow CO_2 + CH_4$	-36	Thauer (1998)
$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$	-131	Thauer (1998)

^a $\Delta G^{\circ'}$ = condiciones estándar considerando el ion H^+ a pH 7.

Monroy (1998), señala que la digestión anaerobia se ha aplicado con éxito a efluentes de tipo municipal, industrial (agro-alimentaria) y más recientemente a la industria química y petroquímica, en donde los compuestos a biodegradar no son fácilmente hidrolizados y fermentados debido a su estructura química, como es el caso de compuestos aromáticos entre ellos algunos isómeros del xileno (Edward y Grbić-Galić, 1994; Da Silva y Alvarez, 2004; Kleerebezem *et al.*, 1999), o por su toxicidad sobre los consorcios bacterianos como

ha sido reportado para compuestos cloro sustituidos, aldehídos y con dobles enlaces carbono-carbono (Chou *et al.*, 1978a). No obstante, los procesos anaerobios han demostrado su eficiente capacidad para remover tóxicos, siempre y cuando estos sean alimentados a concentraciones tales que no afecten a la biomasa, mientras esta se adapta al compuesto a degradar (Speece, 1996).

3. Características químicas y degradación anaerobia de los compuestos estudiados

La mayoría de los compuestos estudiados en este trabajo poseen un grupo carbono carbonilo, que esta constituido por un átomo de carbono unido por un doble enlace a un átomo de oxígeno, este grupo se encuentra altamente polarizado debido a que la nube electrónica es fuertemente atraída hacia el oxígeno, que es el más electronegativo, dando como resultado que el carbono carbonilo sea deficiente en electrones. El átomo de carbono con carga positiva actúa como un electrófilo y el oxígeno como nucleófilo (Morrison y Boyd, 1998; Wade, 1993).

3.1. Alcoholes

3.1.1. Características químicas

En su mayoría los alcoholes son derivados del petróleo; el carbón mineral y el gas natural, son obtenidos por un proceso de descomposición por calor, seguido de un proceso de reformación.

Son compuestos que contienen un grupo alquilo y uno o varios grupos hidroxilo (–OH). Estos grupos son lipófilo e hidrófilo, respectivamente. Dependiendo del número de grupos alquilo unidos al carbono α , que es el que tiene el grupo hidroxilo, se clasifican en primarios secundarios y terciarios. Los compuestos que tienen dos, tres o cuatro sustituyentes –OH se denominan dioles, trioles y tetroles, respectivamente.

El grupo –OH es muy polar y puede establecer puentes de hidrógeno con sus moléculas compañeras, con otras moléculas neutras y con aniones (Morrison y Boyd, 1998). El punto de ebullición se eleva conforme el número de carbonos aumenta (Tabla 1.3), en cambio en alcoholes ramificados con el mismo número de carbonos, disminuye.

Tabla 1.3. Propiedades fisico-químicas de los compuestos estudiados.

Compuestos	Clave	PM	P. Ebullición (°C)	P. Fusión (°C)	Densidad relativa	Solubilidad (mg·L ⁻¹ H ₂ O)	Presión de vapor mmHg(°C)
Metanol ^a	MH	32.04	64.7	-97.8	0.786 (25/4)	Miscible	126(25)
Isopropanol ^a	IH	60.09	82.5	-88.5	0.780 (25/4)	Miscible	45.4(25)
Etilenglicol ^a	GH	62.07	197.6	-13	1.113 (20/4)	Miscible	0.092(25)
Metil acetato ^a	ME	74.08	56.9	-98	0.927 (25/4)	Miscible	216.2(25)
Etil acetato ^a	EE	88.10	77	-83	0.902 (20/4)	90.2	93.2(25)
Isopropil acetato ^a	IE	102.13	89	-	0.870 (20/4)	23	60.3(25)
Anhídrido acético ^a	AE	102.09	139	-73	1.080 (15/4)	Miscible	5.1(25)
Ácido acrílico ^a	AA	72.06	141	14	1.062 (16/4)	Miscible	3.97(25)
Metil acrilato ^{a, b}	MA	86.09	80	-76.5	0.956 (20/4)	60,000	86.6(25)
Butil acrilato ^a	BA	128.17	145	-	0.898 (20/4)	1,400	5.45(25)
<i>o</i> -Xileno ^{a, c, d, e}	OX	106.16	144	-25	0.880 (20/4)	167-221	4.96(20)
<i>m</i> -Xileno ^{a, c, d}	MX	106.16	139.3	-48	0.868 (15/4)	134-196	5.92(20)
<i>p</i> -Xileno ^{a, d, e}	PX	106.16	137	13	0.861 (20/4)	150-215	6.45(20)
Estireno ^{a, c}	ST	104.14	145	-30.6	0.906 (20/4)	281.17	5.0(20)

^aBudavari (1989). ^bMorrison y Boyd (1998). ^cHartley (1990). ^dSmallwood (1996). ^eEnvironmental Health Criteria 190 (1997).

El punto de ebullición es mucho más alto que el de hidrocarburos con el mismo peso molecular y esto se debe a que requieren mayor energía para romper los puentes de hidrógeno que mantienen unidas a moléculas adyacentes; en compuestos con más de un grupo –OH como el etilenglicol (diol), éste se incrementa significativamente (Tabla 1.3) debido a que pueden formar un mayor número de puentes de hidrógeno.

La solubilidad de los alcoholes de cadenas menores a cuatro carbonos es alta ya que su tendencia a formar puentes de hidrógeno favorece esta propiedad, sin embargo a medida que aumenta el número de carbonos la solubilidad decrece. Los compuestos polihidroxilados con un bajo número de carbonos también son miscibles en agua.

Químicamente los alcoholes al ser oxidados pierden uno o más hidrógenos α del carbonilo. Los alcoholes primarios se oxidan a aldehídos o ácidos carboxílicos. Los secundarios a cetonas. Los terciarios no se oxidan debido a que no presentan hidrógenos α .

3.1.2. Degradación biológica

3.1.2.1. Metanol

El metanol es un alcohol primario utilizado como materia prima en la fabricación de formaldehído, clorometanos, metil metacrilato, metilaminas, dimetil tereftalato, anticongelante para radiadores de automóviles y aceite diesel, es usado en gasolinas dado que eleva el índice de octanaje. Se emplea además para la extracción de aceites animales y vegetales o como solvente en la manufactura de colesterol, estreptomycin, vitaminas, hormonas y otros fármacos (Budavari, 1989; EPA, 1994b).

Biológicamente en condiciones anaerobias puede ser transformado hasta metano. Florencio *et al.* (1993), reportan que el metanol puede ser degradado por diferentes vías como se muestra en la Figura 1.5. Las bacterias metanogénicas metilotrofas utilizan directamente al metanol a través de dos rutas distintas que ocurren de manera simultánea: en una el metanol es reducido hasta metano y en la otra el metanol es oxidado hasta CO₂ (1), estos microorganismos derivan de estas reacciones energía para el crecimiento (Keltjens y Vogels, 1993).

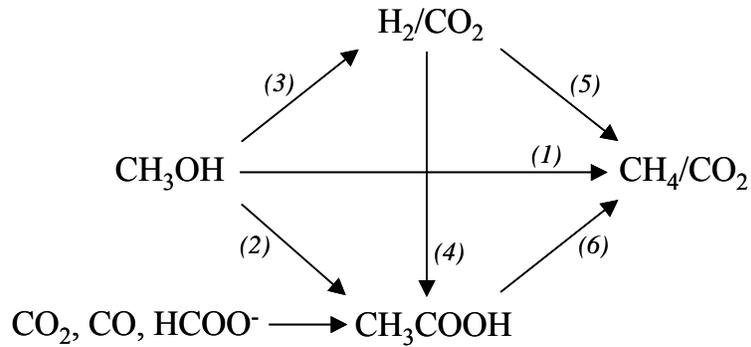


Figura 1.5. Vías involucradas en la degradación de metanol a metano (Florencio *et al.*, 1993).

La acetogénesis del metanol (2) también puede llevarse a cabo utilizando como cosustratos al CO_2 , CO o formiato. Cuando es empleado monóxido de carbono, el carbono del metanol es usado preferentemente para la formación de la parte metilada de la molécula de acetato formada (Schink, 1994). En la reacción (3) se observa que el metanol también puede ser transformado a H_2 y CO_2 , no obstante como se muestra en la ecuación 6 de la Tabla 1.4, esta reacción es endergónica pero se vuelve exergónica cuando la concentración de H_2 se mantiene baja (Cord-Ruwisch y Ollivier, 1986). Finalmente los compuestos formados como H_2 y CO_2 pueden formar acetato por homoacetogénesis (4) o metano por metanogénesis hidrogenotrófica (5), mientras que el acetato formado es utilizado en la metanogénesis acetoclástica para producir metano y CO_2 (6).

Bhatti *et al.* (1996), mencionan que a un pH entre 5.0 y 6.0 disminuye la actividad de las vías (1) y (6) o son suspendidas completamente ya que el crecimiento de *Methanosaeta* y *Methanosarcina* es inhibido, mientras que la metanogénesis hidrogenotrófica no se ve afectada por esta condición. A pH de 7.0 la mineralización directa del metanol (1) se ve favorecida.

3.1.2.2. Isopropanol (2-propanol)

El isopropanol es un alcohol secundario usado en la manufactura de una amplia variedad de lociones y cosméticos similares, como solvente para gomas, lacas, aceites esenciales,

resinas, en la manufactura de acetona, glicerol, isopropil acetato y en procesos farmacéuticos (Budavari, 1989).

Este alcohol es susceptible de ser degradado en condiciones anaerobias. Widdel (1986), aisló dos tipos de bacterias metanogénicas a partir de enriquecimientos con 2-propanol, encontrando que este alcohol es directamente utilizado por estas bacterias como donador de hidrógeno para la reducción de CO₂, donde el isopropanol consumido es transformado hasta acetona y metano según la ecuación 7 (Tabla 1.4).

Tabla 1.4. Reacciones involucradas en la digestión anaerobia de varios compuestos químicos orgánicos.

Ec.	Reacción	$\Delta G^{\circ a}$	Referencia
1	$4\text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$	-106 kJ/mol CH ₄	Keltjen y Vogels (1993)
2	$\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$	-112.5 kJ/mol CH ₄	Keltjen y Vogels (1993)
3	$4\text{CH}_3\text{OH} + 2\text{CO}_2 \rightarrow 3\text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O} + 3\text{H}^+$	-71 kJ/mol acetato	Diekert y Wohlfarth (1994)
4	$\text{CH}_3\text{OH} + \text{CO} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+$	-	Schink (1994)
5	$\text{CH}_3\text{OH} + \text{HCOO}^- \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O}$	-	Schink (1994)
6	$4\text{CH}_3\text{OH} + 8\text{H}_2\text{O} \rightarrow 12\text{H}_2 + 4\text{HCO}_3^- + 4\text{H}^+$	+94 kJ/reacción	Cord-Ruwisch y Ollivier (1986)
7	$4\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow 4\text{CH}_3\text{COCH}_3 + \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	-36.5 kJ	Widdel (1986)
8	$\text{CH}_3\text{COCH}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CH}_4 + \text{CO}_2$	-89.2 kJ/mol	Platen y Schink (1987)
9	$\text{CH}_3\text{COCH}_3 + \text{CO}_{2(\text{aq})} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{H}^+$	-34.2 kJ/mol	Platen <i>et al.</i> (1994)
10	$4\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OH} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 2\text{CH}_3\text{COOH}$	-	Dwyer y Tiedje (1983)
11	$2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COOH} + 4\text{H}_2$	-	Dwyer y Tiedje (1983)
12	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	+9.6 kJ/mol	Thauer <i>et al.</i> (1977)
13	$\text{CH}_3\text{COOCH}_3 + \text{OH}^- \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{CH}_3\text{OH}$	-63.2 kJ/reacción	Liu y Suflita (1994)
14	$3\text{CH}_2 = \text{CHCOO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow$ $\text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$	-49.1 kJ/mol acrílico	Janssen (1991)
15	$2\text{R} - \text{CH}_2\text{OH} + 2\text{HCO}_3^- \rightarrow$ $2\text{R} - \text{COO}^- + \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$	-	Eichler y Schink (1984)
16	$2\text{R} - \text{CH}_2\text{OH} + \text{HCO}_3^- \rightarrow 2\text{R} - \text{COO}^- + \text{CH}_4 + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$	-	Eichler y Schink (1984)

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

La acetona producida puede ser transformada por cultivos anaerobios hasta metano y CO₂ como reportaron Platen y Schink (1987) (ver ecuación 8 de la Tabla 1.4). No obstante, muestran que la degradación se divide en dos fases, en la primera la acetona es fermentada hasta acetato de acuerdo a la ecuación 9, Tabla 1.4. En la segunda este intermediario es consumido por bacterias metanogénicas utilizadoras de acetato, indicando que la degradación se lleva a cabo por sintrofia entre ambas especies. En cultivos donde las bacterias metanogénicas no están activas, concentraciones de acetato de 1200 mg·L⁻¹ inhiben completamente la degradación de acetona. No obstante, Platen *et al.* (1994) reportan que en cultivos mixtos que contienen bacterias fermentativas y metanogénicas activas, el crecimiento y degradación de acetona no dependen de la concentración de acetato, sino de la presencia de ambos cultivos.

3.1.2.3. Etilenglicol

El etilenglicol es un diol usado en la producción de tensoactivos, explosivos, cosméticos, fluidos para transferencia de calor, solventes usados en industrias de lubricantes y plásticos. Es empleado en tintas para impresoras o plumas. Por su bajo punto de congelación, alto punto de ebullición y alta solubilidad (Tabla 1.3) es empleado como anticongelante (Budavari, 1989).

En condiciones anaerobias Dwyer y Tiedje (1983) reportaron que partir de un lodo proveniente de un digestor municipal obtuvieron un consorcio capaz de degradar este compuesto, cuya ruta de degradación se muestra en la Figura 1.6. Es primeramente oxidado hasta acetaldehído (1) seguido de una dismutación dando como productos acetato (2) y etanol (3), posteriormente este último puede ser transformado en acetato (4) y el hidrógeno producido más CO₂ es llevado a metano. Las reacciones (1) y (3) son energéticamente favorables, mientras que la oxidación del etanol a acetato en la reacción (4) sólo se realiza si la concentración de hidrógeno se mantiene baja.

Schink (1984), encontró que el etilenglicol también puede ser fermentado a acetato y propionato. En trabajos posteriores encontraron otras especies que crecieron con etilenglicol como fuente de carbono y que también formaron acetato y etanol (Eichler y Schink, 1985).

Más tarde, Battersby y Wilson (1989), reportaron que el etilenglicol es fácilmente degradado y que grupos carboxilo o hidroxilo facilitan el proceso.

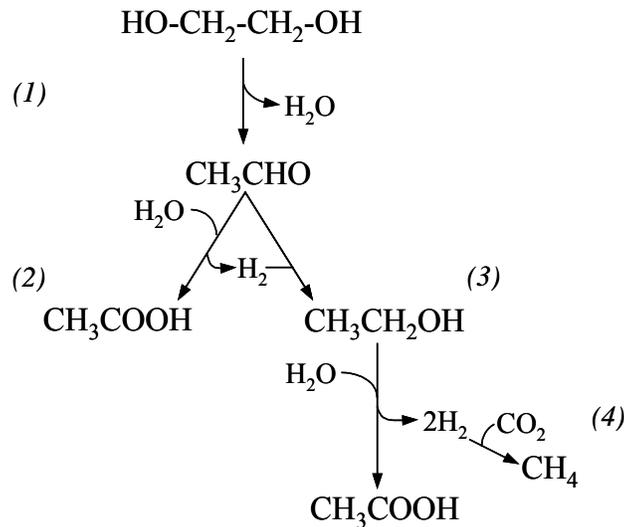


Figura 1.6. Ruta de degradación del etilenglicol propuesta por Dwyer y Tiedje (1983).

3.2. Ésteres del ácido acético

3.2.1. Características químicas

Los ésteres son derivados de ácidos carboxílicos en los cuales el $-\text{OH}$ ha sido remplazado por el grupo R de un alcohol. Los grupos R pueden ser cadenas cortas o largas de tipo alifático (alquilo) o aromático (arilo), saturadas o no saturadas.

Químicamente se pueden hidrolizar a sus respectivos ácidos y alcoholes. La hidrólisis puede ser ácida, dado que es catalizada por iones hidrógeno, pero ésta sólo ocurre a temperaturas altas y puede ser reversible. La hidrólisis también puede ser promovida por una base, pero a diferencia de la anterior no es reversible.

Los ésteres en general son moléculas moderadamente polares, no pueden formar enlaces de hidrógeno entre sí, dado que carecen de grupos hidroxilo; sin embargo, pueden establecer enlaces de hidrógeno con otras moléculas que los contengan (agua, alcoholes, ácidos carboxílicos).

Como se muestra en la Tabla 1.3., los ésteres de bajo peso molecular como el metil, etil e isopropil acetato son solubles en agua, presentando puntos de ebullición que aumentan conforme incrementa el número de carbonos (Wade, 1993).

Aunque en este trabajo el anhídrido acético fue incluido dentro del grupo de los ésteres (Tabla 1.1), éste no lo es. No obstante, al igual que los anteriores, es un derivado de ácidos carboxílicos. Los anhídridos de ácidos carboxílicos son dos moléculas del ácido unidas por un oxígeno y cuya reacción de unión implica una deshidratación. Este puede ser hidrolizado produciendo dos moléculas de ácido acético (Morrison y Boyd, 1998).

Tiene características físicas similares a las de los ésteres, aunque su punto de ebullición es muy elevado y es soluble (Tabla 1.3).

3.2.2. Degradación biológica

3.2.2.1. Metil acetato

Es empleado como solvente para nitrocelulosa, acetil celulosa, aceites, grasas, resinas, barnices, lacas, en la manufactura de seda y pieles artificiales (Budavari, 1989).

Se ha reportado al metil acetato como un compuesto que no causa toxicidad a bacterias metanogénicas (Chou *et al.*, 1978a). Sin embargo poco se ha estudiado acerca de cómo los microorganismos realizan la degradación de este compuesto en condiciones anaerobias. Rakov *et al.* (1991), encontraron que dos cultivos de *Pseudomona* sp hidrolizaron este éster llevándolo hasta metanol y acetato, la reacción fue catalizada por la enzima inducible carboxil esterasa presente en estos microorganismos. Liu y Suflita (1994), reportaron dos microorganismos anaerobios *Acetobacterium woodii* y *Eubacterium limosum*, capaces de hidrolizar metil acetato dando como productos el ácido carboxílico y un alcohol, señalando que esta reacción es energéticamente favorable (ecuación 13, Tabla 1.4), en cultivos en crecimiento el metanol fue oxidado a formiato y persistió en cultivos en estado estacionario. Sin embargo ambos intermediarios son susceptibles de ser llevados hasta metano por metanogénesis acetoclástica y degradación de metanol como se describió en las secciones 2.3.1 y 3.1.2.1.

3.2.2.2. Etil acetato

Este es utilizado como saborizante en esencias artificiales de frutas, como solvente para nitrocelulosa, barnices, lacas y en la fabricación de pieles artificiales, papel fotográfico, seda, perfumes y limpieza de textiles (Budavari, 1989).

El etil acetato no causa toxicidad a bacterias metanogénicas (Chou *et al.*, 1978a). Estudios posteriores han mostrado que este compuesto puede ser degradado eficientemente por digestión anaerobia (Shelton y Tiedje, 1984; Schwartz, 1991; Kleerebezem y Macarie, 2003). No obstante, los pasos a través de los cuales se degrada no han sido reportados. Si la hidrólisis del éster fuera realizada podría producir acetato y etanol, consecutivamente estos pueden ser degradados hasta metano como se describió anteriormente (sec. 2.3.1 y 3.1.2.3).

3.2.2.3. Isopropil acetato

El isopropil acetato es utilizado como solvente en derivados de celulosa, plásticos, aceites y grasas y es empleado en la fabricación de perfumes.

Biológicamente en condiciones de anaerobiosis este compuesto puede sufrir degradación. Fox y Ketha (1996), señalan que la hidrólisis da como productos acetato e isopropanol. El acetato es transformado por bacterias metanogénicas acetoclásticas a metano, mientras que el isopropanol será reducido hasta acetona la cual se transforma a CH₄ y CO₂ como se describió en la sección 3.1.2.2.

3.2.2.4. Anhídrido acético

Es uno de los compuestos más importantes a nivel industrial. Se emplea en la manufactura de acetatos de celulosa para plásticos y fibras, en síntesis de medicamentos como la aspirina, como solvente de aceites y grasas volátiles. Es ampliamente utilizado en síntesis orgánicas y en reacciones donde la remoción de agua es necesaria (Budavari, 1989).

La biodegradación anaerobia de este compuesto no ha sido estudiada, pero químicamente al hidratarse forma dos moléculas de acetato, el cual es precursor del metano en la metanogénesis acetoclástica.

3.3. Ésteres del ácido acrílico

3.3.1. Características químicas

El ácido acrílico y sus ésteres, son alquenos dado que en su estructura tienen un enlace doble carbono-carbono. Uno de los enlaces es fuerte (δ) y el otro débil (π), el segundo forma una nube de electrones por encima y por debajo del plano de los átomos de carbono, atrayendo compuestos deficientes en electrones (electrófilos). Por lo que, la reacción más frecuente que este tipo de moléculas sufre es la adición de reactivos ácidos o adición electrofílica, dando como productos alcanos.

Se clasifican también como compuestos carbonílicos α , β -no saturados, ya que además del doble enlace C=C, tienen un doble enlace C=O, lo que les confiere otras propiedades y tipos de adición a las que sufren los alquenos simples. El doble enlace C=C en un alqueno no es polar, mientras que el enlace C=C conjugado con un grupo carbonilo es polar. En este tipo de moléculas el átomo de carbono β y el carbonílico llevan una carga positiva parcial y el oxígeno carbonílico una carga negativa parcial, por lo que, pueden sufrir tanto adición nucleofílica en el doble enlace C=C, como electrofílica en el doble enlace C=O (Morrison y Boyd, 1998; Carey, 1999).

El metil y el butil acrilato por ser ésteres pueden ser hidrolizados a su respectivo ácido y alcohol. Dentro de las propiedades físicas, el ácido acrílico es completamente soluble en agua, el metil acrilato es moderadamente soluble, mientras que el butil acrilato es poco soluble (Tabla 1.3).

3.3.2. Degradación biológica

3.3.2.1. Ácido acrílico

El ácido acrílico es empleado en la manufactura de plásticos, es un producto intermediario en la fabricación de resinas, adhesivos, fibras sintéticas, dispersantes y floculantes. Una de sus principales aplicaciones es en la producción de ésteres como el etil, n-butil, metil y 2-etilhexil acrilato, así como de ácido poliacrílico. Es utilizado en la fabricación de resinas de intercambio iónico (Budavari, 1989; Environmental Health Criteria 191, 1997).

La degradación biológica anaerobia es a través de su fermentación, que probablemente ocurre de manera similar a la vía de la acrilil-CoA (Janssen, 1991), en la cual como se muestra en la Figura 1.7 una molécula de lactato es transformada a piruvato, con la subsiguiente formación de acetyl-CoA que finalmente produce acetato (Gottschalk, 1986).

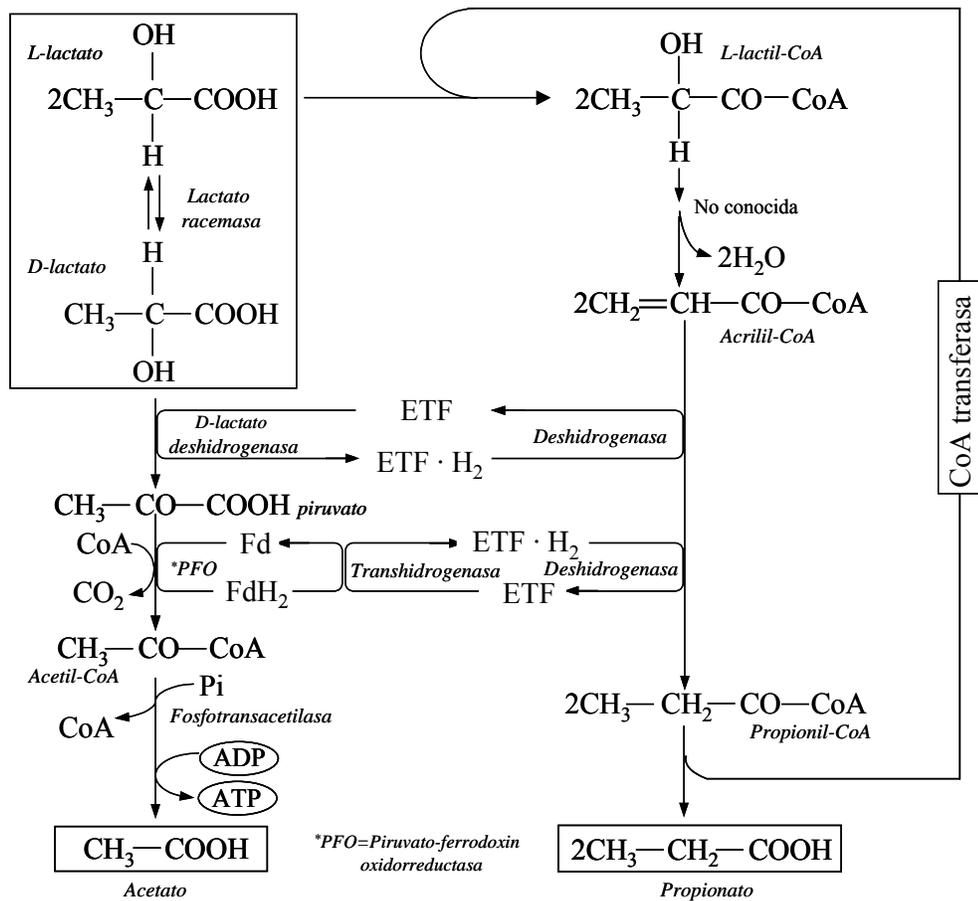


Figura 1.7. Degradación de lactato hasta acetato, propionato y CO_2 (Gottschalk, 1986), probablemente similar a la seguida para la fermentación de acrilato (Janssen, 1991).

Entonces análogamente una molécula de ácido acrílico pasa a través de estos diferentes pasos para dar como producto final acetato, CO_2 y cuatro equivalentes reducidos como $[4\text{H}^+] = 2\text{H}_2$. Por otra parte dos moléculas de lactato son convertidas a lactil-CoA, que se deshidrata formando acrilil-CoA que es reducida a propionil-CoA en donde el donador de H_2 es la flavoproteína $\text{ETF} \cdot \text{H}_2$ que transfiere los electrones necesarios para saturar el doble enlace y finalmente producir propionato (Gottschalk, 1986). Similarmente, dos moléculas de ácido acrílico son activadas a acrilil-CoA y reducidas a propionato utilizando los cuatro

equivalentes producidos durante la oxidación del ácido acrílico. Pocos microorganismos entre ellos *Clostridium propionicum* son capaces de llevar a cabo esta vía.

Janssen (1991) reporta, que *Clostridium propionicum* denominada 19acry3 fermenta ácido acrílico hasta acetato, propionato y CO₂ en una relación molar 1:2:1 respectivamente y la reacción (dismutación) ocurre de acuerdo a la ecuación 14 (Tabla 1.4).

Tschech y Pfennig (1984), reportaron el crecimiento de *Acetobacterium woodii* asociado a la reducción de cafeato, en donde la parte acrílica de este compuesto se reduce a hidrocafeato utilizando como donadores de electrones al metanol o formiato, vainillato o ferulato. Sin embargo, otra bacteria anaerobia estricta (*Peptostreptococcus productus*) en presencia de CO, redujo la cadena acrílica de algunos compuestos aromáticos pero no utilizó el ácido acrílico, por lo que concluyen que la capacidad de los microorganismo para reducir la cadena acrílica de un aromático no esta relacionada a la habilidad para utilizar el ácido acrílico (Parekh *et al.*, 1992).

3.3.2.2. Metil acrilato y butil acrilato

El metil acrilato es utilizado en la manufactura de textiles, resinas y películas plásticas. El butil acrilato es empleado en la producción de polímeros, terminación de pieles y formulaciones para pinturas y adhesivos.

Ambos compuestos en condiciones anaerobias pueden ser hidrolizados dando como productos el ácido carboxílico (ácido acrílico) y su respectivo alcohol (metanol o butanol) (Dohányos *et al.*, 1988). El metanol y el ácido acrílico posteriormente pueden ser degradados como se mostró en la sección 3.1.2.1 y 3.3.2.1 respectivamente. Mientras que el butanol tal como reportaron Eichler y Schink (1984), puede ser fermentado por bacterias homoacetogénicas como *Acetobacterium carbinolicum* sp. nov., hasta acetato y butirato (ecuación 15, Tabla 1.4), o bien en co-cultivo con una bacteria metanogénica *Methanospirillum hungatei* produciendo metano y butírico, en donde la fermentación es una combinación entre la ecuación 15 y 16 de la Tabla 1.4.

3.4. Hidrocarburos aromáticos: arenos

3.4.1. Características químicas

Los compuestos que tienen una unidad aromática así como una cadena hidrocarbonada lineal son llamados arenos; a su vez estos se dividen en alquil, alquenil y alquilbencenos si la cadena lineal es un alcano, un alqueno o un alquilo, respectivamente. El xileno y sus isómeros *orto*, *meta* y *para* son alquilbencenos 1,2; 1,3 y 1,4 dimetil sustituidos, respectivamente (Morrison y Boyd, 1998).

Químicamente los alquilbencenos pueden sufrir oxidación en la cadena alifática en presencia de un oxidante como el permanganato de potasio (KMnO₄), dando como productos ácidos carboxílicos, por ejemplo el *p*-xileno es oxidado a ácido tereftálico. Además de la oxidación, pueden sufrir sustitución o halogenación en el anillo aromático, halogenación en las cadenas laterales, etc.

Los alquenilbencenos de los cuales el estireno es el compuesto más sencillo, pueden sufrir reacciones de sustitución en el anillo ó de adición en el doble enlace carbono-carbono de la parte alifática. Aunque las dos partes de la molécula son susceptibles de sufrir un ataque electrofílico, el anillo se estabiliza por resonancia, por lo que, la mayor reactividad se presenta generalmente en el doble enlace carbono-carbono de la cadena lineal, además de que se requieren condiciones más suaves para su oxidación y si estas son adecuadas se hidrogena la cadena lineal y el anillo permanece intacto, por ejemplo el estireno es transformado a etil benceno. La oxidación suave en el doble enlace también puede llevar a formar un 1,2 diol, una oxidación más fuerte llevaría hasta un ácido carboxílico (Morrison y Boyd, 1998).

Los arenos son compuestos de baja polaridad, son menos densos que el agua, son insolubles en agua, aunque Hartley (1990) y la Environmental Health Criteria, 190 (1997), reportaron que bajas concentraciones de xilenos y estireno se solubilizan (Tabla 1.3), el punto de ebullición aumenta con el incremento del peso molecular. El isómero *para* tiene un punto de fusión mayor que los otros dos, probablemente debido a la simetría de la molécula.

3.4.2. Degradación biológica

3.4.2.1. *o, m, p*-Xileno

Los xilenos son utilizados principalmente como solventes, materia prima para la producción de ácido benzoico, anhídrido ftálico, ácidos isoftálico y tereftálico. En mezcla son usados en la fabricación de perfumes, insecticidas, pinturas, tintas para impresoras, adhesivos, caucho y en la síntesis de productos farmacéuticos. Además se emplean en gasolinas de alto octanaje (Budavari, 1989; Environmental Health Criteria, 190, 1997).

En ambientes anaerobios donde existen aceptores de electrones como el SO_4^- , NO_3^- , Fe (III), Mn (IV) y CO_2 los compuestos aromáticos son fácilmente degradados. En ambientes donde no están presentes y las bacterias no tienen la capacidad de atacar directamente el anillo bencénico, el mecanismo de degradación de aromáticos solubles requiere de tres etapas generales como lo reportan Fuchs *et al.* (1994), Heider y Fuchs (1997) y Strand (2005). En la primera etapa el compuesto debe ser activado mediante una serie de reacciones que sufren los sustituyentes como son oxidación o reducción, rompimiento de enlaces carbono-carbono, carboxilación, descarboxilación, hidroxilación, remoción de grupos O-metilo, remoción de sulfuro o nitrógeno. Estas reacciones son empleadas por los microorganismos como fuente de carbono, energía y nitrógeno (Heider y Fuchs, 1997; Strand, 2005). Posteriormente, los compuestos activados son transformados a intermediarios centrales como resorcinol (1,3-bencenodiol), floroglucinol (1,3,5-bencenotriol) y principalmente benzoil-CoA que es el intermediario más común de la degradación de diferentes aromáticos sustituidos (Gibson y Harwood, 2002). En una segunda etapa estos intermediarios son atacados enzimáticamente por reductasas dando compuestos alicíclicos. En la tercera etapa estos son transformados a compuestos simples como la acetil-CoA por una vía semejante a la β -oxidación. En el caso de la benzoil-CoA en estas dos últimas etapas se transforma a ciclohexil-1,5-dieno-1-carboxil-CoA, que a través de una serie de reacciones es llevada hasta acetil-CoA como muestran Heider y Fuchs (1997). La acetil-CoA es utilizada finalmente para la síntesis de acetato o biomasa (Fuchs *et al.*, 1994; Strand, 2005; Drake, 1994).

La degradación anaerobia del xileno y sus tres isómeros (*orto*, *meta* y *para*) se ha estudiado principalmente en condiciones nitrato y sulfato reductoras. En nitrato reducción el primer paso durante la oxidación del *m-o*-xileno (Figura 1.8) es la adición de fumarato a uno de los grupos metilo, formándose 3-metilbencilsuccinato o 2-metilbencilsuccinato cuando el sustrato es *o*-xileno, esta reacción es mediada por la enzima 3-metilbencil-succinato sintetasa. Subsecuentemente son oxidados a 3-metilbenzoato o 2-metilbenzoato, seguidos de una transformación a intermediarios centrales como la benzoil-CoA (Chakraborty y Coates, 2004).

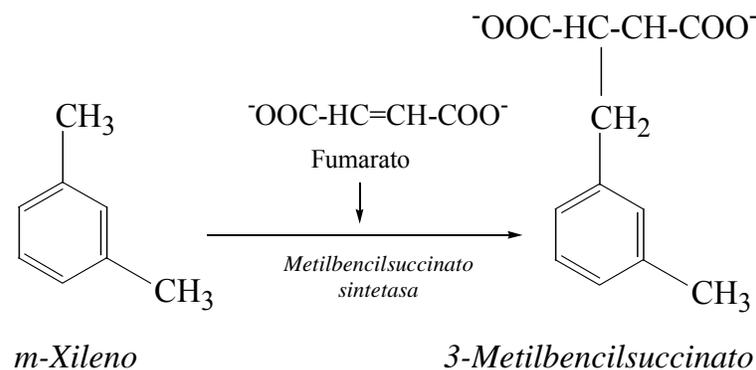


Figura 1.8. Adición de fumarato al grupo metilo del *meta*-xileno para formar metilbencilsuccinato.

En condiciones metanogénicas estos compuestos han resultado ser de difícil degradación. Edward y Grbić-Galić (1994), reportaron que un consorcio de este tipo degradó *orto*-xileno, sin embargo no presentó capacidad para utilizar *meta* y *para*-xileno. Similarmente, Kleerebezem *et al.* (1999) encontraron que después de 500 días el *p*-xileno no se degrada. Recientemente Da Silva y Alvarez (2004), empleando columnas bioaumentadas con un consorcio que contenía el gene que codifica para la enzima bencilsuccinato sintetasa, encontraron que el *o*-xileno puede ser eficientemente degradado, caso contrario del *m* y *p*-xileno.

3.4.2.2. Estireno

El estireno es usado en la fabricación de plásticos de poliestireno, caucho sintético y como material aislante (Budavari, 1989). Grbić-Galić *et al.* (1990), estudiaron la degradación de estireno utilizando un consorcio metanogénico y encontraron que el proceso aparentemente es fermentativo o probablemente el estireno y algunos de los productos

intermediarios fueron tóxicos para el consorcio, ya que no observaron la presencia de metano. A partir de los intermediarios encontrados sugieren tres vías posibles de degradación, de las cuales, en la que se forman productos precursores de la metanogénesis como el acetato es la llamada ruta del fenilacetato (Figura 1.9).

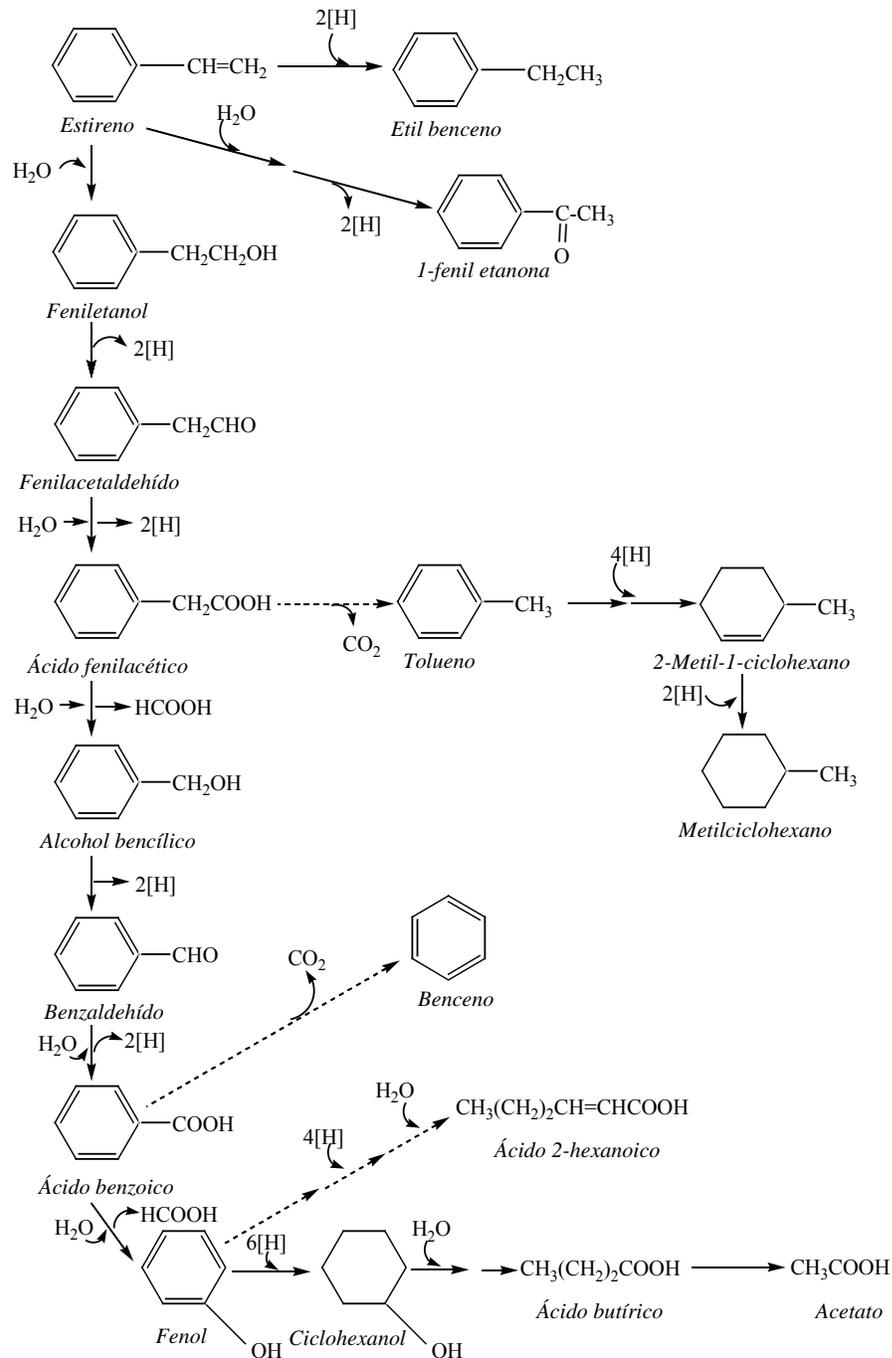


Figura 1.9. Vía de degradación de estireno seguida por un consorcio anaerobio metanogénico (Grbić-Galic *et al.*, 1990).

En esta, el doble enlace de la cadena lateral primeramente es hidratado, con la oxidación simultánea de un átomo de carbono y la reducción de otro dando como producto feniletanol, que consecutivamente es transformado a fenilacetaldehído y ácido fenilacético.

Este último a través de una descarboxilación oxidativa es convertido a alcohol bencílico y posteriormente oxidado hasta benzaldehído y ácido benzoico, que nuevamente es descarboxilado formándose fenol. Su reducción lleva a la formación de ciclohexanol que, al igual que el ácido benzoico, es precursor de la formación de ácidos alifáticos de cadenas larga y corta como el ácido butírico y acético.

4. Toxicidad de los compuestos químicos

La capacidad de una sustancia de provocar un efecto perjudicial sobre un organismo o su biocenosis se define como toxicidad y esta puede ser a nivel celular, enzimático o inclusive sobre el organismo completo. El grado de toxicidad puede variar de acuerdo al tipo de sustancia, concentración y del tiempo o frecuencia de exposición (Ronco *et al.*, 2004). Se ha encontrado que los catorce compuestos estudiados en este trabajo son tóxicos a humanos, así como a la flora y fauna de ambientes acuáticos. En la Tabla 1.5., se presentan algunos efectos y concentraciones a los que causan toxicidad.

Tabla 1.5. Toxicidad de los compuestos petroquímicos en humanos, peces, crustáceos y algas.

	Humanos	Peces	Crustáceos	Algas
MH ^a	Inhalación, ingestión y contacto con la piel	Salmón <i>Gairdneri</i> CL ₅₀ (96 h) 10.8 g·L ⁻¹ Carpa común 20.1 -28.1 g·L ⁻¹	<i>Artemia</i> CL ₅₀ (24 h) 10 g·L ⁻¹ <i>Dafnia magna</i> CE ₅₀ (48 h) 24.5 g·L ⁻¹	8.0 g·L ⁻¹
IH ^{b, c}	Dermatitis e irritación de ojos, garganta y nariz		<i>Dafnia magna</i> y otros CE ₅₀ 2.3 a 9.7 g·L ⁻¹	
GH ^d	Exposición, inhalación y contacto con la piel	<i>Carassius auratus</i> CL ₅₀ (24) 5 g·L ⁻¹	<i>Dafnia magna</i> CE ₅₀ (48h) >1 g·L ⁻¹	<i>Desmodesmus subspicatus</i> CI ₅₀ (72) >1 g·L ⁻¹

Continuación. Tabla 1.5.

	Humanos	Peces	Crustáceos	Algas
ME ^d	Inhalación causa: somnolencia y vértigo Grietas en la piel	<i>Danio vero</i> CL ₅₀ (96 h) 250-350 mg·L ⁻¹	<i>Dafnia magna</i> CE ₅₀ (48 h) 1027 mg·L ⁻¹	CI ₅₀ (72 h) >120 mg·L ⁻¹
EE ^e	Inhalación causa: somnolencia, vértigo, náusea y dolor de cabeza	CL ₅₀ (96 h) 212 a 230 mg·L ⁻¹	Ajolote mexicano* CL ₅₀ (48 h) 150 mg·L ⁻¹	
IE ^f	Narcosis e irritación: ojos, nariz y garganta			
AE ^{g, e}	Líquido o vapores (0.09 mg·L ⁻¹): grave irritación piel, ojos y membranas mucosas	Trucha y carpa dorada (no causa toxicidad)		<i>Chlorella pyrenoidosa</i> 360 mg·L ⁻¹
AA ^{h, i}	Ingestión Absorción por inhalación y piel	Trucha arco iris CL ₅₀ (96 h) 27 mg·L ⁻¹ No equilibrio y nado errático (6.3 mg·L ⁻¹) Carpa común CL ₁₀₀ (24 h) 100 mg·L ⁻¹	<i>Dafnia</i> CE ₅₀ (24-48 h) 95 y 765 mg·L ⁻¹	CE ₅₀ 0.04 a 63 mg·L ⁻¹
MA BA ^{e, j}	Irritan severamente: piel y membranas mucosas	CL ₅₀ y CE ₅₀ 1.1 a 8.2 mg·L ⁻¹		CE ₅₀ (72 y 96 h) 7.3 y 5.2 mg·L ⁻¹
PX ^k MX ^k OX ^k	Inhalación afecta sistema sensorial, procesamiento de información y sistema nervioso central	Agua dulce CL ₅₀ (24-48-96 h) 2.6 - 36.8 mg·L ⁻¹ Marinos 1.7-10 mg·L ⁻¹	<i>Dafnia magna</i> CL ₅₀ (24-48 h) OX(1 a 3.82 mg·L ⁻¹) MX(4.7 a 9.6 mg·L ⁻¹) PX(3.6-8.5 mg·L ⁻¹)	
ST ^l	Vapores causan: irritación de ojos, tracto respiratorio y sistema nerviosos central		<i>Dafnia magna</i> CL ₅₀ (24 y 48 h) 27 y 23 mg·L ⁻¹	CL ₅₀ (96 h) 25 a 74.8 mg·L ⁻¹

^aEPA (1994b). ^bOSHA (1996b). ^cEnvironmental Health Criteria 103 (1990). ^dMerck (2004). ^eGangolli (2005). ^fOSHA (1999). ^gOSHA (1996a). ^hEPA (1994a). ⁱEnvironmental Health Criteria 191 (1997). ^jStaples *et al.* (2000). ^kEnvironmental Health Criteria 190 (1997). ^lEPA (1994c). ^mRonco *et al.* (2004).

CL₅₀ y CL₁₀₀ = Concentración que resulta letal para el 50% o 100% de los organismos expuestos a una sustancia tóxica durante un período especificado. CE₅₀/CI₅₀ = Concentración a la que la sustancia tóxica provoca inmovilidad o reducción del crecimiento en el 50% de los organismos considerados^m. *Anfibio.

5. Justificación

La mayoría de los compuestos petroquímicos seleccionados, pueden ser degradados por digestión anaerobia como sustratos únicos. En el caso de los alcoholes, se han reportado diversos estudios que incluyen las posibles vías involucradas durante su degradación y los niveles que se alcanzan. Para los ésteres del ácido acético, los reportes se limitan al conocimiento de los niveles de biodegradabilidad y poco se sabe de los intermediarios generados y de las vías que estos siguen para ser transformados a metano. Del ácido acrílico y sus ésteres, los reportes muestran cómo el primero puede ser convertido a sustratos que pueden ser posteriormente metabolizados por bacterias acetogénicas y metanogénicas, sin embargo se considera como un sustrato de difícil degradación ya que causa toxicidad sobre algunos grupos bacterianos. De sus ésteres se han dilucidado algunos procesos como la hidrólisis, sin embargo no se han mostrado directamente los intermediarios generados y las vías que estos siguen para ser completamente degradados. Los estudios acerca de los compuestos aromáticos incluidos en este trabajo, también se han limitado a determinar los niveles de biodegradación, excepto para el estireno.

Sin embargo la biodegradación de todos los compuestos, ya sea agrupados por similitud de estructuras químicas o en mezclas complejas como la que formarían los catorce compuestos seleccionados, no ha sido estudiada. Tal estudio determinaría la factibilidad de degradar biológicamente mezclas de varios compuestos, a través del conocimiento de las posibles interacciones químicas y biológicas entre estos y la interacción entre tóxicos e intermediarios durante este proceso. Con lo cual se pudiera proponer un proceso de tratamiento sustentable. Por lo que para abordar este tema se planteó la siguiente hipótesis y objetivos.

6. Hipótesis

En el proceso de digestión anaerobia, la integración de diferentes grupos bacterianos con metabolismos variados: fermentativos, acidogénicos, metanogénicos, que funcionan mediante sintrofismos, permitirá la conversión y degradación de sustratos con estructuras químicas diversas que estarían presentes de manera simultánea en aguas de desecho.

7. Objetivos

7.1. Objetivo general

Evaluar la biodegradación anaerobia de compuestos petroquímicos con diferentes estructuras químicas, entre los que se encuentran alcoholes, ésteres acéticos, ésteres acrílicos y aromáticos, en sistemas en lote y continuos.

7.2. Objetivos Particulares

- Evaluar la biodegradabilidad anaerobia de compuestos petroquímicos en sistemas en lote y evaluar los índices de toxicidad de estos compuestos sobre la metanogénesis acetoclástica.
- Determinar la capacidad de tratamiento de un proceso anaerobio continuo para una mezcla compleja de compuestos.
- Evaluar la biodegradación del compuesto más tóxico, como el ácido acrílico en presencia de otros compuestos fácilmente biodegradables de la mezcla, como los alcoholes.

8. Metas

Para alcanzar los objetivos se plantearon las siguientes metas:

- Probar la biodegradación anaerobia de alcoholes y ésteres, por separado y en mezcla, siguiendo los intermediarios formados y los niveles de mineralización.
- Determinar la concentración inhibitoria de las mezclas de ésteres del ácido acético, ésteres del ácido acrílico y alcoholes a la cual la actividad metanogénica acetoclástica específica disminuiría en un 50%.
- A través del análisis del desempeño de un reactor UASB, determinar la capacidad de degradación de la mezcla de los 14 compuestos seleccionados alimentados en baja concentración, adicionando uno a uno hasta alcanzar una mezcla compleja.

- Determinar el efecto de la carga orgánica volumétrica sobre la eficiencia de remoción del reactor, a través de la disminución del tiempo de retención hidráulico, así como encontrar los compuestos que no se degradarían bajo estas condiciones.
- En procesos en lote y continuos determinar la interacción entre compuestos tóxicos y de fácil degradación, tales como el ácido acrílico y metanol, etanol, etilenglicol, isopropanol y butanol.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Introducción

En este Capítulo se presentan los materiales y metodología utilizados en este trabajo. En la Figura 2.1, se muestra el procedimiento experimental que se compone de tres etapas, biodegradabilidad en sistemas en lote, en pruebas en continuo y biodegradabilidad del ácido acrílico con alcoholes. Cada uno se describe en las secciones 3, 4 y 5, respectivamente.

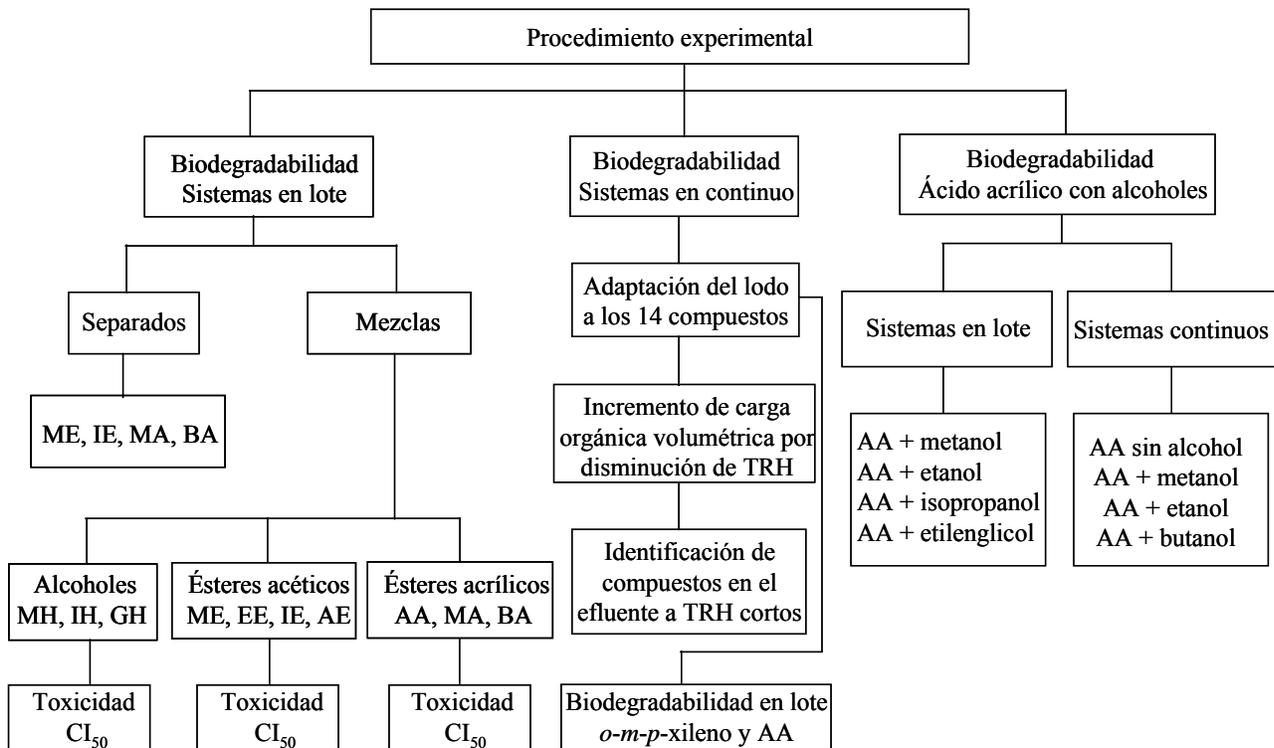


Figura 2.1. Panorama general del procedimiento experimental utilizado en este trabajo.

2. Generales

2.1. Demanda química de oxígeno (DQO) teórica

Para cada uno de los compuestos probados se calculó el equivalente de la DQO como se muestra en la Tabla 2.1, según la reacción estequiométrica (ecuación 2.1) de la combustión de compuestos orgánicos reportada por Kleerebezem y Macarie (2003).

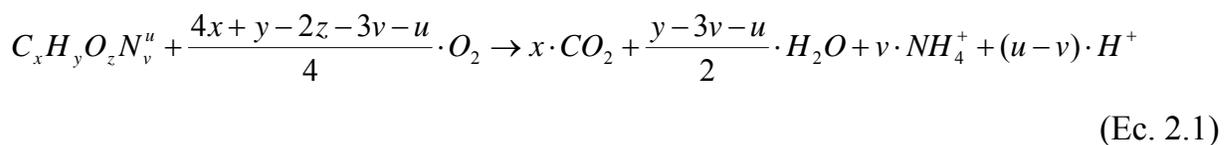
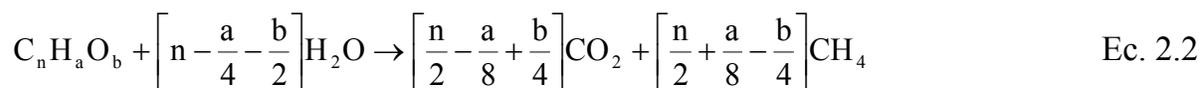


Tabla 2.1. Demanda química de oxígeno equivalente de los compuestos.

Compuestos	Fórmula	Nomenclatura	DQO _{teórica} (g _{oxígeno} /g _{compuesto})
Metanol	CH ₄ O	MH	1.49
Isopropanol	C ₃ H ₈ O	IH	2.39
Etilenglicol	C ₂ H ₆ O ₂	GH	1.28
Metil acetato	C ₃ H ₆ O ₂	ME	1.51
Etil acetato	C ₄ H ₈ O ₂	EE	1.81
Isopropil acetato	C ₅ H ₁₀ O ₂	IE	2.03
Anhídrido acético	C ₄ H ₆ O ₃	AE	1.25
Ácido acrílico	C ₃ H ₄ O ₂	AA	1.33
Metil acrilato	C ₄ H ₆ O ₂	MA	1.67
Butil acrilato	C ₇ H ₁₂ O ₂	BA	2.24
<i>p</i> -Xileno	C ₈ H ₁₀	PX	3.16
<i>m</i> -Xileno	C ₈ H ₁₀	MX	3.16
<i>o</i> -Xileno	C ₈ H ₁₀	OX	3.16
Estireno	C ₈ H ₈	ST	3.07

2.2. Estimación del metano teórico

El metano que se produciría de la reducción de cada uno de los compuestos se calculó de la reacción estequiométrica propuesta por Tarvin y Buswell (1934), citada por Shelton y Tiedje (1984), ecuación 2.2. Esta reacción no considera la proporción de sustrato que se va a síntesis de biomasa.



2.3. Medios de cultivo

En las pruebas de biodegradabilidad y reactores continuos, se usó el medio de cultivo reportado por Balch *et al.* (1979), ver Tabla 2.2. Mientras que, en los experimentos de

toxicidad se empleó el medio de cultivo formulado para experimentos en lote por Visser (1995), ver Tabla 2.3

Tabla 2.2. Medio de cultivo (Balch *et al.*, 1979).

Composición de las soluciones				Soluciones	
Solución	g·L ⁻¹	Solución	g·L ⁻¹	Solución	mL·L ⁻¹
Mineral I		Mineral II		Mineral I	50
KH ₂ PO ₄	6.0	K ₂ HPO ₄	6.0	Mineral II	50
Cloruro de níquel		NH ₄ Cl	2.4	Oligoelementos	10
NiCl ₂	0.05	NaCl	12.0	Vitaminas	10
Sulfato ferroso		MgCl ₂ ·6H ₂ O	2.1	Cloruro de níquel	10
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.0	CaCl ₂ ·H ₂ O	0.16	Sulfato ferroso	1.0
Oligoelementos		Vitaminas			
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.0	Biotina	0.0020		
MnSO ₄ ·2H ₂ O	0.5	Ácido fólico	0.0020		
NaCl	1.0	Piridoxina	0.0100		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.10	Tiamina	0.0050		
CoCl ₂	0.10	Riboflavina	0.0050		
ZnSO ₄	0.10	D, L-ácido			
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.01	pantoténico	0.0050		
AlK(SO ₄) ₂	0.01	Vitamina B ₁₂	0.0001		
H ₃ BO ₃	0.01	Ácido <i>p</i> -amino			
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.01	benzoico	0.0050		
		Ácido lipoico	0.0050		

Tabla 2.3. Medio de cultivo (Visser, 1995).

Macronutrientes		Elementos traza.	
Compuestos	mg·L ⁻¹	Compuestos	mg·L ⁻¹
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	703	FeCl ₂ ·4H ₂ O	2000
K ₂ HPO ₄	600	MnCl ₂	500
NH ₄ Cl	280	EDTA	500
MgSO ₄ ·7H ₂ O	111	Na ₂ SeO ₃	100
CaCl ₂ ·2H ₂ O	6	H ₃ BO ₃	50
Extracto de levadura	20	ZnCl ₂	50
Soln. de elementos traza	1 mL·L ⁻¹	(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

2.4. Sólidos suspendidos volátiles

La determinación de los sólidos suspendidos volátiles (SSV) es un método directo para estimar la concentración de biomasa. Se realizó secando un volumen conocido de lodos en una estufa a 105 °C durante 2 horas, para cuantificar los sólidos suspendidos totales. Posteriormente los lodos se calcinaron a 550°C por 30 minutos para conocer el contenido de sólidos fijos. La concentración de sólidos suspendidos volátiles se obtuvo de la diferencia entre los totales y los fijos (APHA, 1995).

3. Ensayos de biodegradación de alcoholes y ésteres en sistemas en lote

Los compuestos químicos probados fueron ácido acrílico y sus ésteres butil y metil acrilato; ésteres del ácido acético tal como metil, etil e isopropil acetato y anhídrido acético; alcoholes como metanol, isopropanol y etilenglicol.

3.1. Compuestos probados por separado

Se realizaron ensayos en lote, probando por separado metil acetato, isopropil acetato, metil acrilato y butil acrilato, las concentraciones iniciales se muestran en la Tabla 2.4 y se eligieron para obtener una relación másica de alrededor de 0.1 gDQO·gSSV⁻¹.

Tabla 2.4. Concentración inicial para los compuestos probados por separado.

Compuesto	Nomenclatura	mM	mg·L ⁻¹	mgDQO·L ⁻¹
Metil acetato	ME	8.6	637	962
Isopropil acetato	IE	3.3	334	680
Metil acrilato	MA	5.6	486	812
Butil acrilato	BA	1.9	241	541

3.2. Compuestos probados en mezcla

Los compuestos se agruparon por similitud de estructuras químicas y las mezclas probadas fueron las siguientes: a) alcoholes integrada por metanol, isopropanol y etilenglicol; b) ésteres del ácido acético formada por metil acetato, etil acetato, isopropil acetato y anhídrido acético y c) ésteres del ácido acrílico compuesta por ácido acrílico, metil

y butil acrilato. La concentración alimentada de cada compuesto se muestra en la Tabla 2.5 y se seleccionó con la finalidad de tener una relación másica alrededor de $0.1 \text{ gDQO} \cdot \text{gSSV}^{-1}$ en cada mezcla.

Tabla 2.5. Concentración inicial de los compuestos probados en mezcla.

Mezcla	Compuesto	Nomenclatura	mM	mg·L ⁻¹	mgDQO·L ⁻¹
Alcoholes	Metanol	MH	8.6	276	413
	Isopropanol	IH	2.07	125	298
	Etilenglicol	GH	4.2	263	337
Ésteres del ácido acético	Metil acetato	ME	1.34	100	151
	Etil acetato	EE	1.25	110	201
	Isopropil acetato	IE	0.59	61	124
	Anhídrido acético	AE	0.84	86	108
Ésteres del ácido acrílico	Ácido acrílico	AA	3.0	218	291
	Metil acrilato	MA	1.7	146	244
	Butil acrilato	BA	0.63	80	181

3.3. Preparación de los sistemas en lote

Las pruebas se llevaron a cabo en botellas serológicas de 60 mL, adicionando 20 mL de medio de cultivo y $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de bicarbonato de sodio, inoculadas con 5 mL de lodo no aclimatado, con una concentración de $45.8 \text{ gSSV} \cdot \text{L}^{-1}$. Las botellas se taparon con septos de neopreno forrados con teflón, se engargolaron con arillos de aluminio y se intercambiaron la atmósfera, introduciendo durante dos minutos una corriente gaseosa de una mezcla 80%/20% de N_2 y CO_2 . La alimentación de sustrato se hizo con 2 ml de una solución concentrada del compuesto o de la mezcla de compuestos correspondientes a cada experimento. Para la mezcla de alcoholes y ésteres del ácido acético, el pH de esta solución se ajustó previamente a 7.0 con NaOH. Posteriormente se incubaron a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ sin agitación. Se prepararon botellas por duplicado para cada tiempo de muestreo que fueron desechadas.

3.4. Tratamiento de las muestras

Cada seis horas, con jeringas desechables se tomaron muestras de 1.5 mL de cada botella y se vaciaron en viales plásticos, se taparon y sellaron con papel parafilm. Los viales se centrifugaron por 20 minutos a 10417 x g. Posteriormente 0.95 mL de la muestra se colocaron en viales de vidrio de 2.0 mL y se acidificaron con 0.05 mL de HCL al 50 %, estas se taparon utilizando septos de teflón. Finalmente las muestras fueron analizadas por cromatografía de gases.

3.5. Determinación de sustratos

Para la determinación por cromatografía de gases (CG) de cada uno de los sustratos y sus intermediarios, estudiados por separado o en mezcla (excepto para la mezcla de ésteres del ácido acético), se preparó un solución estándar concentrada a partir de la cual se realizaron diluciones en el intervalo de concentración requerido para cada prueba (ver Tabla 2.6). Cada estándar de 0.95 mL fue acidificado con 0.05 mL de HCL al 50%. Posteriormente se analizaron en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890, con una columna capilar AT-1000 y con un detector de ionización de flama (FID). Las condiciones de separación para cada compuesto o mezcla se describen en la Tabla 2.6.

Para la determinación de la mezcla de ésteres del ácido acético, se prepararon concentraciones en el intervalo mostrado en la Tabla 2.6. Posteriormente, en frascos serológicos de 13 mL se adicionaron 2 mL del estándar más 2 g de NaCl, se taparon con septos y arillos de aluminio, incubándose a baño maría por 10 minutos a 30 °C. Posteriormente se inyectaron 0.5 mL de la fase gas de los frascos a un cromatógrafo de gases Hewlett Pakcard 5890, con una columna 5% Carbowax, 60/80 Carbopack y detector FID. Las condiciones de operación se describen en la Tabla 2.6.

Los parámetros de la curva estándar se obtuvieron de la regresión lineal entre la concentración ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) con respecto al área de respuesta (unidades de área). Posteriormente, las muestras obtenidas de cada experimento fueron tratadas como se describió en la sección

3.4 y analizadas por CG, estimando la concentración a partir de los parámetros obtenidos en la respectiva curva estándar.

Los cromatogramas obtenidos en la separación de los compuestos probados en mezcla se muestran en las Figuras 2.2a, b y c.

Tabla 2.6. Condiciones de operación del cromatógrafo de gases y parámetros obtenidos para la determinación de sustratos e intermediarios.

Compuesto (s)	Sustratos e intermediarios	Intervalo de concentración (mg·L ⁻¹)	Temperatura de la columna (°C)	Curva estándar y = mx + b		
				m	b	r ²
Isopropil acetato	Isopropil acetato	0-300	3 min a 80°C; 50°C/min hasta 120°C (mantener por 3 min)	846.71	5715.9	0.9964
	Acetona			795.84	952.27	0.9989
	Isopropanol			1247.2	4827.4	0.9925
	Acetato			529.05	933.5	0.9989
Metil acetato	Metil acetato	0-600	3 min a 80°C; 50°C/min hasta 120°C (mantener por 3 min)	494.31	9393.1	0.9975
	Metanol			691.73	25.268	0.9995
	Acetato			565.4	1007.0	0.9988
Mezcla de alcoholes	Metanol	0-500	45°C/4.5 min	532.87	424.11	0.9987
	Isopropanol			1061.6	133.01	0.9990
	Acetona			652.39	53.60	0.9998
	Etanol			1089.60	119.82	0.9985
Mezcla de ésteres del ácido acrílico	Metanol	0-500	5 min a 50°C; 50°C/min hasta 120°C (mantener por 4.5 min)	632.84	136.93	0.9986
	Metil acrilato			755.81	1532.23	0.9988
	Butil propionato			735.38	5773.17	0.9961
	Butil acrilato			958.60	1595.01	0.9985
	Butanol			1336.56	-4726.7	0.9988
	Acetato			476.69	6005.86	0.9962
	Propionato			855.46	-32.61	0.9990
	Butirato			888.96	1667.98	0.9986
Ácido acrílico	741.34	2282.65	0.9984			
^a Mezcla de Ésteres del ácido acético	Etanol	0-200	50°C hasta 110°C a 5 °C/min (mantener por 2 min)	382.98	-1658.7	0.9886
	Metanol			133.08	-1049.1	0.9841
	Acetona			1626.99	-4313.2	0.9951
	Isopropanol			406.51	-1689.3	0.9884
	Isopropil acetato			11198.3	-58013.2	0.9932
	Etil acetato			3918.3	-16732.0	0.9943
	Metil acetato			2599.5	-8286.7	0.9955

Inyector y detector 130 y 150°C, respectivamente. ^aInyector y detector 115 y 200°C. y = unidades de área, m = unidades de área/ mg·L⁻¹, x = mg·L⁻¹ y b = unidades de área.

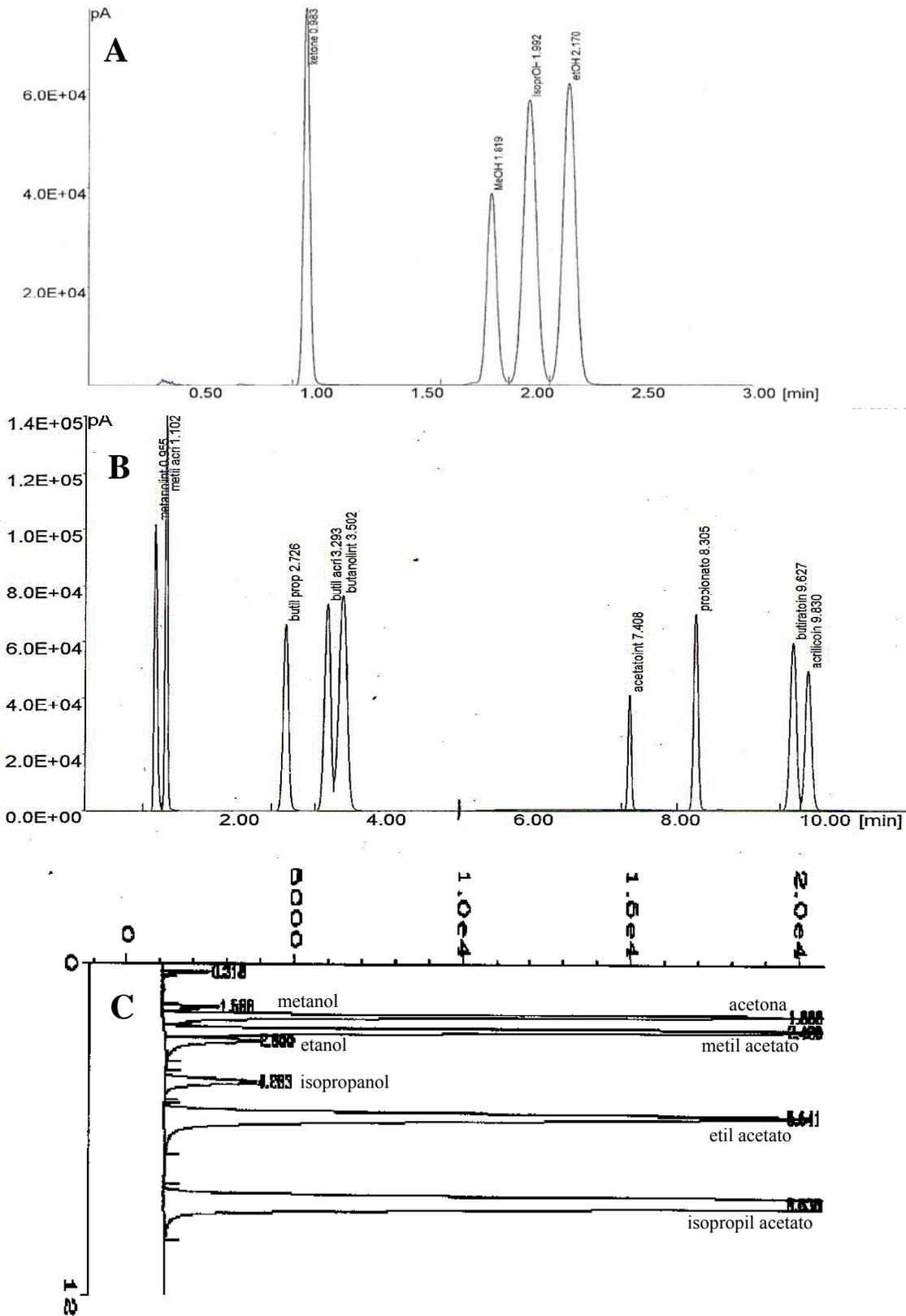


Figura 2.2. Resolución y tiempos de retención de los diferentes compuestos e intermediarios que integran cada una de las mezclas (A) alcoholes; (B) ésteres del ácido acrílico y (C) ésteres del ácido acético.

3.6. Producción de metano

La producción de metano en estas pruebas se siguió por desplazamiento de una solución de NaOH al 3%. Una vez preparada esta solución, se llenaron tubos Hungate y se taparon evitando la presencia de burbujas de aire. Como se muestra en la Figura 2.3, los tubos se colocaron en un portatubos con la tapa hacia abajo, insertándole una aguja que permitiera la salida de la solución hacia una probeta.

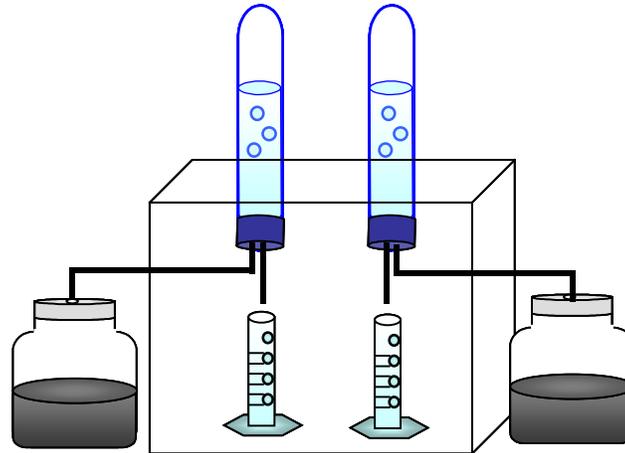


Figura 2.3. Sistema de medición por desplazamiento de una solución de NaOH al 3% para la producción de metano.

Posteriormente, se conectó una manguera de látex con una aguja en los extremos del tubo de solución y de la botella serológica, el metano producido desplazó la solución de NaOH que se midió en una probeta graduada de 10 mL. Las mediciones se realizaron cada seis horas.

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.

$$V_{\text{CH}_4\text{STP}} (\text{L}) = V_p (\text{L}) \times \frac{273^\circ \text{K}}{308^\circ \text{K}} \times \frac{585 \text{ mmHg}}{760 \text{ mmHg}} \quad (\text{Ec. 2.3})$$

$$\text{gDQO} - \text{CH}_4 = V_{\text{CH}_4\text{STP}} (\text{L}) \times \frac{\text{DQO}(\text{g})}{0.35(\text{L}_{\text{CH}_4})} \quad (\text{Ec. 2.4})$$

$$n_{\text{CH}_4} = \frac{0.7697(\text{atm}) \times V_p(\text{L})}{0.082 \left(\frac{\text{L} \cdot \text{atm}}{\text{mol} \cdot ^\circ\text{K}} \right) \times 308 ^\circ\text{K}} \quad (\text{Ec. 2.5})$$

Donde:

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

V_p = volumen parcial de metano producido

3.7. Pruebas de toxicidad de las mezclas de compuestos

Se realizaron pruebas de toxicidad de las mezclas de alcoholes, ésteres del ácido acético y ésteres del ácido acrílico sobre la metanogénesis acetoclástica. Se llevaron a cabo en botellas serológicas de 60 mL, se inocularon con 2 gSSV·L⁻¹ y 40 mL de medio de cultivo (Visser, 1995), ver Tabla 2.3. Se alimentaron con 2.5 g de acetato·L⁻¹ durante 24 h, posteriormente se les adicionaron diferentes concentraciones del tóxico. La concentración estuvo compuesta por proporciones iguales en gDQO·L⁻¹ de cada compuesto que constituyó la mezcla. Para los alcoholes las concentraciones fueron 1, 2, 3, 10, 15, 25 y 30 gDQO·L⁻¹, para los ésteres del ácido acético se probaron 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 y 70 gDQO·L⁻¹ y para la mezcla de ésteres del ácido acrílico fueron 55, 109, 162, 313 y 500 mgDQO·L⁻¹. Para cada prueba se prepararon controles sin tóxico. La exposición al tóxico fue durante 72 h, posteriormente este se retiró y los ensayos se realimentaron con acetato (1 gDQO·L⁻¹), cuantificándose cada hora la producción de metano como se describió en la sección 3.6, este se ajustó a condiciones estándar (Ec. 2.3) y se calculó su equivalente en DQO (Ec. 2.4). La actividad metanogénica específica se determinó como se presenta en la sección 3.9, ec. 2.7. Los resultados de toxicidad están expresados como actividad metanogénica específica relativa a los controles no expuestos (100% de la actividad).

3.8. Balances

Los balances molares en cada una de las pruebas se calcularon a partir de las ecuaciones estequiométricas mostradas en las Tablas 1.2 y 1.4 del Capítulo I.

3.9. Velocidad específica de consumo de sustrato y/o producción de metano

La velocidad específica de consumo y/o hidrólisis del sustrato ($V_{EC/H}$) 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. 2.6).

$$V_{EC/H} = \frac{m(\text{gS/L} \cdot \text{d})}{X(\text{g/L})} \quad (\text{Ec. 2.6})$$

Donde:

S = Sustrato (compuesto o DQO)

m = pendiente = $\text{gS} \cdot \text{L}^{-1}$ respecto al tiempo (d)

X = biomasa (SSV)

La velocidad específica de producción de metano o actividad metanogénica específica (términos utilizados indistintamente), se calculó de acuerdo a la ec. 2.7, la pendiente se obtuvo del metano producido expresado como DQO respecto al tiempo. La pendiente se calculó en el intervalo de mayor velocidad de producción de metano.

$$V_{\text{EspCH}_4} = \frac{m(\text{gDQO} - \text{CH}_4/\text{L} \cdot \text{d})}{X(\text{g/L})} \quad (\text{Ec. 2.7})$$

m = pendiente = $\text{gDQO} - \text{CH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$ contra el tiempo

X = biomasa (SSV)

4. Pruebas para evaluar la degradación de la mezcla de compuestos en un sistema continuo

4.1. Reactor

Se utilizó un reactor tipo UASB de vidrio (Figura 2.4), con un volumen de 1.4 litros. Se inoculó con 500 mL de lodo proveniente de la planta de tratamiento de aguas residuales municipales de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, el cual presentó una concentración de sólidos suspendidos volátiles (SSV) de $22 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. La alimentación del reactor se mantuvo a una temperatura de 4°C y a una distancia de 20 cm de la entrada del

reactor, con la finalidad de evitar pérdidas de los compuestos en tuberías. El reactor se operó a una temperatura de 35 ± 2 °C.

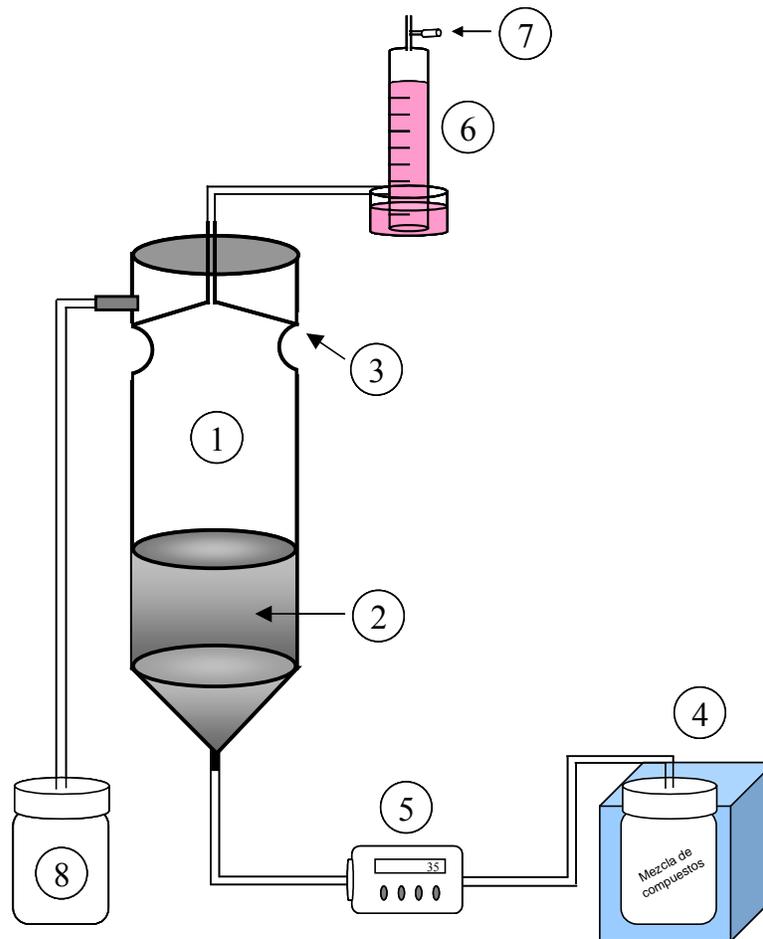


Figura 2.4. Diagrama del reactor UASB en donde: 1) cilindro de vidrio; 2) lecho de lodos; 3) sistema de separación líquido-gas; 4) bidón de alimentación; 5) bomba peristáltica; 6) columna de desplazamiento para medición de biogás; 7) puerto de muestreo para biogás; 8) bidón para el efluente.

4.2. Adaptación del lodo a los 14 compuestos

Durante la adaptación del lodo a los compuestos, el reactor se operó a una carga orgánica volumétrica de $2 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. La relación másica específica aplicada fue de $0.25 \text{ gDQO} \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ y se operó a un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 12 h.

4.2.1. Alimentación del reactor

Para la preparación de la alimentación se utilizó el medio de cultivo descrito en la Tabla 2.2. Los compuestos químicos se adicionaron en etapas subsecuentes como se muestra en la Tabla 2.7. La DQO global de alimentación fue de $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. En cada etapa la proporción alimentada de los compuestos se recalculó para mantener la misma proporción de DQO de cada uno en la mezcla (Tabla 2.7). Posterior a la adición de todos los sustratos, el pH del medio se ajustó a 7.0 con NaOH.

Para observar el efecto de un nuevo compuesto sobre el desempeño del reactor, la adición del siguiente compuesto se realizó hasta que el anterior alcanzó eficiencias de remoción por arriba del 90%.

Tabla 2.7. Estrategia de alimentación en cada una de las etapas en el reactor UASB.

Etapas	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
^a gDQO·L ⁻¹	1	0.33	0.25	0.2	0.16	0.14	0.11	0.1	0.09	0.08	0.077	0.07
	mg·L ⁻¹											
Metanol	667.6	222.5	166.9	133.5	111.3	95.3	74.2	66.7	60.7	55.6	51.3	47.7
Isopropanol + Anhídrido acético		139.4	104.6	83.6	69.7	59.7	46.5	41.8	38.0	34.8	32.2	29.9
		266.0	199.5	159.6	133.0	114.0	88.7	79.8	72.5	66.5	61.4	57.0
Butil acrilato			111.3	89.01	74.1	63.6	49.4	44.5	40.4	37.1	34.2	31.8
Metil acrilato				119.6	99.6	85.4	66.4	59.8	54.4	49.8	46.0	42.7
Metil acetato					110.4	94.6	73.6	66.2	60.2	55.2	50.9	47.3
Ácido acrílico						107.3	83.4	75.1	68.2	65.5	57.7	53.6
Etil acetato + Isopropil acetato							61.2	55.1	50.0	45.9	42.4	39.3
							54.6	49.1	44.6	40.9	37.8	35.8
Etilenglicol								77.6	70.6	64.7	59.7	55.4
<i>p</i> -xileno									28.7	26.33	24.3	22.5
<i>m</i> -xileno										26.33	24.3	22.5
<i>o</i> -xileno											24.3	22.5
Estireno												22.5

^aConcentración de cada compuesto para obtener $1 \text{ gDQO}\cdot\text{L}^{-1}$.

4.2.2. Bioensayos de degradabilidad

Al final de la etapa VI se realizaron pruebas de biodegradabilidad para el AA de acuerdo a la metodología descrita en la sección 3.3. La concentración de SSV del lodo del reactor fue de $24.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. El ácido acrílico se alimentó a dos concentraciones 71.4 y $350 \text{ mgDQO}\cdot\text{L}^{-1}$. Como control se empleó un lodo no adaptado a este compuesto.

Por otra parte, al término de la etapa XII se realizaron pruebas de degradación para PX, MX y OX y las concentraciones probadas fueron 133 , 56 , y $85 \text{ mgDQO}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente. La concentración del lodo fue de $24 \text{ gSSV}\cdot\text{L}^{-1}$. Se utilizaron botellas serológicas de 60 mL , adicionándoles 50 mL de medio de cultivo (Tabla 2.2), más 5 mL de lodo proveniente del reactor. Estas se taparon con tapones de hule y se engargolaron con arillos de aluminio. Posteriormente se intercambió la atmósfera (sección 3.3). Finalmente los sustratos se inyectaron con una jeringa de $10 \mu\text{L}$. Las botellas se mantuvieron en agitación en una incubadora orbital a una temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Se prepararon botellas para cada tiempo de muestreo y por triplicado. Los xilenos y la producción de metano se monitorearon por CG como se describe en las secciones 4.4.5 y 4.4.6.

4.3. Aumento de la carga orgánica volumétrica (B_v) con disminución del TRH

Una vez que el reactor se alimentaba con la mezcla de catorce compuestos, a una concentración de $0.071 \text{ gDQO}\cdot\text{L}^{-1}$ cada uno, el TRH se disminuyó de 12 a 8 , 6 , 5 , 4 y 3 horas. Durante los dos últimos periodos los compuestos químicos presentes en la salida del reactor se monitorearon individualmente por cromatografía de gases (ver apartado 4.4.7). El promedio y desviación estándar se estimaron de nueve muestras para cada TRH.

4.4. Parámetros monitoreados

4.4.1. Demanda química de oxígeno (DQO)

La DQO es una medida del oxígeno requerido para oxidar todos los compuestos tanto orgánicos como inorgánicos presentes en agua contaminada, se realiza a través de la acción de agentes fuertemente oxidantes y un medio ácido. Para la determinación se utilizó la técnica de digestión por reflujo cerrado (APHA, 1995). Las muestras se centrifugaron a

10417 x g durante cinco minutos, posteriormente se les adicionó dicromato de potasio con ácido sulfúrico y sulfato de plata, se colocaron en una parrilla de digestión durante 2 horas a 150 °C. La determinación de la absorbancia fue colorimétrica a una longitud de onda de 620 nm; la concentración se determinó de los parámetros obtenidos de una curva estándar con glucosa, donde $m = \text{absorbancia}/\text{mgDQO}\cdot\text{L}^{-1}$, $b = \text{absorbancia}$. La DQO se midió diariamente en el influente y efluente del reactor.

4.4.2. pH

El pH se midió diariamente en el influente y efluente del reactor utilizando un potenciómetro Cole-Parmer 59003-20, con un electrodo Conductronic, calibrado a una temperatura de 25 °C.

4.4.3. Relación de alcalinidades

La relación de alcalinidades es un método que estima la capacidad de amortiguamiento del sistema, a través de la medida indirecta de ácidos grasos volátiles y bicarbonato, la relación debe mantenerse de 0.5-0.7 lo que indica una alcalinización eficiente (Jenkins *et al.*, 1983). Del efluente del reactor se tomaron muestras de 25 mL, se titularon con una solución 0.02 N de H₂SO₄ hasta un pH 5.75 (promedio al que se titulan el 80 % de los carbonatos), la titulación se continuó hasta un pH 4.3 (promedio al que se titulan los AGV). Los volúmenes gastados fueron registrados, calculándose la relación de alcalinidades ó α de acuerdo a la ecuación 2.8.

$$\alpha = \frac{\text{Alc}(\text{HCO}_3^-)_{5.75}}{\text{Alc}(\text{total})_{4.3}} \quad (\text{Ec. 2.8})$$

Donde:

$\text{Alc}(\text{HCO}_3^-)_{5.75}$ = mL ácido consumido para llevar el pH original a 5.75.

$\text{Alc}(\text{total})_{4.3}$ = mL ácido consumido para llevar el pH de 5.75 a 4.3.

4.4.4. Biogás, cantidad y composición

El volumen de biogás producido en el reactor, se midió por desplazamiento de una solución salina saturada en una columna de vidrio de 25 cm de altura por 4 cm de diámetro. La composición del biogás se determinó tomando muestras de 0.1 mL del puerto de muestreo (Figura 2.4) y analizándolas por cromatografía de gases, para lo que se procedió primeramente a realizar una curva estándar de una mezcla de metano y bióxido de carbono.

Para la curva se llenaron tubos Hungate con solución salina, se taparon con septos y tapones de rosca, observando que no presentaran burbujas de aire. Posteriormente con una jeringa de 10 ml y a presión atmosférica fueron inyectados en partes proporcionales volúmenes de CH₄ y CO₂ (Tabla 2.8), desplazando simultáneamente la solución salina a una probeta en donde se verificó que el volumen de gas inyectado correspondiera al volumen de solución salina desplazado.

Tabla 2.8. Proporciones de CH₄ y CO₂ inyectados en los tubos Hungate.

Tubos	CH ₄ (mL)	CO ₂ (mL)	% CH ₄	%CO ₂
1	10	0	100	0
2	9	1	90	10
3	8	2	80	20
4	7	3	70	30
5	6	4	60	40
6	5	5	50	50
7	4	6	40	60
8	3	7	30	70
9	2	8	20	80
10	1	9	10	90
11	0	10	0	100

De cada estándar se tomaron 0.1 ml de la fase gaseosa y se inyectaron en un cromatógrafo de gases GOW-MAC, con una columna Carbosphere 80/100 y detector de conductividad térmica (TCD). Las temperaturas de la columna, inyector y detector fueron 140, 170 y 190 °C, respectivamente.

Con las unidades de área registradas se obtuvo la fracción de metano en cada uno de los tubos como se muestra en la ecuación 2.9.

$$\text{Fracción de metano} = \frac{\text{u. área (CH}_4\text{)}}{\text{u. área (CH}_4\text{)} + \text{u. área (CO}_2\text{)}} \quad (\text{Ec. 2.9})$$

Finalmente se realizó una regresión lineal entre la fracción de metano y el porcentaje de metano de cada proporción, los parámetros obtenidos fueron $m = \% \text{ CH}_4/\text{fracción de metano}$, $b = \% \text{ CH}_4$. A partir del área obtenida de la muestra del reactor, se calculó la fracción de metano y con los parámetros de la curva estándar se estimó el porcentaje de CH_4 .

4.4.5. Determinación de xilenos

Para la determinación de estos sustratos se siguió la metodología descrita en la sección 3.5, excepto que la adición de los compuestos se realizó directamente a cada botella con una micro jeringa de $10\mu\text{L}$. Las condiciones de resolución y parámetros de la curva estándar se muestran en la Tabla 2.9.

Tabla 2.9. Condiciones de separación del xileno y sus isómeros.

Compuesto	Intervalo de concentración ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Temperatura de la columna ($^{\circ}\text{C}$)	Curva estándar $y = mx+b$		
			m	b	r^2
<i>para</i> -Xileno	0-50	60 $^{\circ}\text{C}$ /5 min	929.41	-213.7	0.9977
<i>orto</i> - Xileno	0-50		1622.3	-425.5	0.9973
<i>meta</i> -Xileno	0-50		1571.9	1196.1	0.9964

Inyector y detector 130 y 150 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. y = unidades de área, m = unidades de área/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, x = $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y b = unidades de área.

4.4.6. Determinación de metano en las pruebas de degradación de xilenos

Se realizó una curva estándar de metano empleando botellas serológicas de 60 mL que se llenaron con 50 mL de H_2O , se taparon con septos de hule y se engargolaron con arillos de aluminio. Posteriormente con una jeringa desechable de 10 mL fueron introducidos diferentes volúmenes de CH_4 que correspondieron a 63, 94, 126 y 150 μmol . En el mismo equipo utilizado en la sección 4.4.4 se analizaron muestras de la fase gas de las botellas. La cantidad de CH_4 en μmoles respecto de las unidades de área obtenidas se linealizaron y los

parámetros fueron m = unidades de área/ μmol de CH_4 , b = unidades de área. El metano producido en las pruebas se calculó a partir de los parámetros obtenidos en la curva estándar.

4.4.7. Determinación de los compuestos en el efluente del reactor a un TRH de 4 y 3 h

Debido al influente tan complejo, el cual contenía la mezcla de los 14 compuestos, sólo se cuantificaron los compuestos presentes en el efluente del reactor. Primero se identificaron de manera individual, posteriormente se preparó una solución estándar de la mezcla de metil acetato, metil acrilato, *m-p-o*-xileno, butil acrilato, estireno, acetato y ácido acrílico, a partir de ésta se realizaron diluciones (Tabla 2.10) y se analizaron por cromatografía de gases.

Las condiciones de resolución y parámetros se muestran en la Tabla 2.10. El butil acrilato y *o*-xileno, así como *m-p*-xileno se detectaron juntos debido a que no se logró su separación. La concentración de las muestras obtenidas del efluente del reactor se estimó a partir de los parámetros obtenidos en la curva estándar. En la Figura 2.5 se presenta el cromatograma de separación los compuestos.

Tabla 2.10. Parámetros para la determinación de cada uno de los compuestos presentes en el efluente del reactor a 4 y 3 h de TRH.

Compuesto	Intervalo de concentración ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Temperatura de la columna ($^{\circ}\text{C}$)	Curva estándar $y = mx+b$		
			m	b	r^2
Metil acetato	0-20		495.29	-65.27	0.9995
Metil acrilato	0-20		790.48	114.33	0.9994
<i>m-p</i> -xileno	0-40	3 min a 50°C , $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 150°C (mantener durante 5 min)	940.07	-14.17	0.9964
<i>orto</i> -xileno-butyl acrilato	0-20		1412.80	-38.44	0.9967
Estireno	0-20		1266.4	-53.75	0.9987
Acetato	0-20		543.78	172.12	0.9989
Ácido acrílico	0-20		706.48	-89.20	0.9989

Inyector y detector 130 y 150°C , respectivamente. y = unidades de área, m = unidades de área/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, x = $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y b = unidades de área.

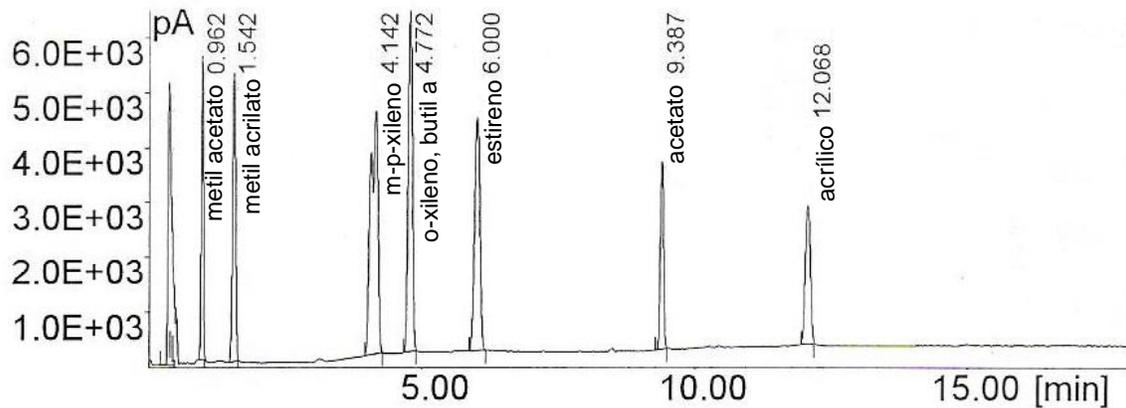


Figura 2.5. Cromatograma de los compuestos identificados en el efluente del reactor a 4 y 3 horas de TRH.

4.4.8. Parámetros de operación del reactor

Se fijó el TRH y a partir de éste, se calculó el gasto de alimentación.

$$\text{Gasto (L} \cdot \text{d}^{-1}) = \frac{\text{Reactor (L)}}{\text{TRH (d)}} \quad (\text{Ec. 2.10})$$

La carga orgánica volumétrica (B_v) se estimó de la concentración en la alimentación dividida por el TRH

$$B_v (\text{gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}) = \frac{\text{DQO (g/L)}}{\text{TRH (d)}} \quad (\text{Ec. 2.11})$$

El biogás producido se llevó a condiciones estándar de temperatura y presión.

$$\text{Biogás}_{\text{producido STP}} (\text{L} \cdot \text{d}^{-1}) = \text{Biogás}_{\text{producido}} (\text{L} \cdot \text{d}^{-1}) \times \frac{273^\circ \text{K}}{308^\circ \text{K}} \times \frac{585 \text{ mmHg}}{760 \text{ mmHg}} \quad (\text{Ec. 2.12})$$

El metano producido se estimó a partir del volumen de biogás, multiplicado por el porcentaje de metano en la muestra.

$$\text{Metano}_{\text{producido STP}} (\text{L} \cdot \text{d}^{-1}) = \text{Biogás}_{\text{producido STP}} (\text{L} \cdot \text{d}^{-1}) \times \frac{\text{CH}_4 (\%)}{100} \quad (\text{Ec. 2.13})$$

El metano producido se transformó a su equivalente en DQO.

$$\text{DQO} - \text{CH}_4 (\text{g} \cdot \text{L}_{\text{reactor}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}) = \frac{\text{metano}_{\text{producido STP}} (\text{L/d})}{0.35 (\text{LCH}_4/\text{gDQO})} \times \frac{1}{V_{\text{reactor}} (\text{L})} \quad (\text{Ec. 2.14})$$

La eficiencia de remoción (η) se calculó a partir del sustrato consumido (DQO) y se expresó como porcentaje.

$$\eta(\%) = \frac{\text{DQO}_{\text{influyente}} (\text{g/L}) - \text{DQO}_{\text{efluente}} (\text{g/L})}{\text{DQO}_{\text{influyente}} (\text{g/L})} \times 100 \quad (\text{Ec. 2.15})$$

El metano teórico se obtuvo de la cantidad de DQO consumida multiplicada por el equivalente de metano en DQO.

$$\text{Metano}_{\text{teórico}} (\text{L} \cdot \text{d}^{-1}) = \text{Gasto} (\text{L/d}) \times \text{DQO}_{\text{influyente}} (\text{g/L}) \times \frac{\eta}{100} \times 0.35 (\text{LCH}_4/\text{gDQO}) \quad (\text{Ec. 2.16})$$

5. Pruebas para determinar la biodegradabilidad del ácido acrílico con alcoholes

5.1. Alcoholes probados en lote

Los alcoholes probados en la degradación del ácido acrílico (AA) fueron metanol (MH), isopropanol (IH), etanol (EH) y etilenglicol (GH). Las cinéticas se realizaron utilizando 5 mL de lodo proveniente de la planta de tratamiento de aguas residuales de la UAM-I, con una concentración de $24.3 \text{ gSSV} \cdot \text{L}^{-1}$. El lodo se aclimató previamente con glucosa alcanzando una actividad metanogénica específica de $0.65\text{-}0.96 \text{ gDQO} \cdot \text{CH}_4 \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. La preparación de las botellas y toma de muestras se llevaron a cabo de acuerdo a la metodología descrita en la sección 3.3 y 3.4. Para cada tiempo de muestreo se prepararon botellas independientes y por duplicado las cuales fueron desechadas después del muestreo. Los alcoholes se adicionaron a una relación másica de $0.5 \text{ gDQO} \cdot \text{gSSV}^{-1}$ del alcohol respectivo más $0.5 \text{ gDQO} \cdot \text{gSSV}^{-1}$ de ácido acrílico, las concentraciones alcohol/acrílico alimentadas se muestran en la Tabla 2.11.

Tabla 2.11. Concentración de ácido acrílico y del alcohol respectivo.

Sustratos	Metanol	Isopropanol	Etanol	Etilenglicol
Alcohol ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	297	158	273	364
Acrílico ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	287	258	252	242

5.2. Determinación de sustratos, intermediarios y productos

Los sustratos y sus intermediarios se determinaron como se describió en la sección 3.5, los intervalos de concentración, condiciones de separación y parámetros obtenidos se muestran en la Tabla 2.12. La producción de metano se siguió por desplazamiento de una solución de NaOH al 3% como se describió en la sección 3.6. Las velocidades específicas de consumo de los compuestos o de producción de metano en cada prueba, se calcularon como se describió en la sección 3.9.

5.3. Alcoholes probados en experimentos en continuo

Debido a que en las pruebas en lote la degradación del ácido acrílico no fue del todo favorecida por la presencia del etilenglicol y del isopropanol, en los experimentos en continuo no se evaluaron. Los alcoholes probados en esta etapa fueron metanol, etanol y butanol.

5.3.1. Reactores

Los experimentos se realizaron en cuatro reactores UASB de 0.3 L de volumen (Figura 2.4), se inocularon con 100 mL de lodo proveniente de la planta de tratamiento de aguas residuales de la UAM-I, con una concentración de SSV de $24.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Todos los reactores se operaron a 12 h de TRH.

5.3.2. Alimentación de los reactores

En una primera etapa denominada de aclimatación, los reactores se alimentaron con medio de cultivo (Tabla 2.2) y se adicionó acetato ($317.4\pm 41 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y propionato ($611.3\pm 67 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) más un alcohol: metanol ($358.9\pm 36 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), etanol ($261.5\pm 35 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) o butanol ($334.2\pm 30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); otro reactor utilizado como control sólo se alimentó con acetato y propionato. En una segunda etapa, en los cuatro reactores el acetato y propionato se dejaron de adicionar y se alimentaron con $918.3\pm 69 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido acrílico más el respectivo alcohol. Los reactores se denominaron RC (control), RM (metanol), RE (etanol), RB (butanol). En la etapa de adición del ácido acrílico las concentraciones iniciales de acetato y propionato se calcularon a partir de la relación molar de sustratos y productos de la

reacción de degradación del ácido acrílico reportada por Janssen (1991); ver Tabla 1.4, ecuación 14.

5.3.3. Parámetros monitoreados

Los sustratos e intermediarios en cada uno de los reactores se siguieron diariamente por cromatografía de gases como se describe en la sección 3.5, en la Tabla 2.12 se muestran las condiciones de operación del cromatógrafo y los parámetros obtenidos. El comportamiento del pH, relación de alcalinidades y producción de metano se determinaron como se describió en la sección 4.4.

Tabla 2.12. Condiciones de separación de los sustratos e intermediarios y parámetros obtenidos.

Prueba	Sustratos e intermediarios	Intervalo de concentración (mg·L ⁻¹)	Curva estándar y = mx+b			
			m	b	r ²	
Metanol-acrílico	Metanol	0-500	647.58	-2454.20	0.9956	
	Acetato		512.63	755.33	0.9967	
	Propionato		856.6	1728.26	0.9915	
	Acrílico		871.98	-1681.30	0.9969	
Lote Isopropanol-acrílico	Acetona	0-500	1034.59	412.42	0.9997	
	Isopropanol		1188.6	890.26	0.9997	
	Acetato		507.85	4948.39	0.9970	
	Propionato		881.83	2377.46	0.9888	
Etanol- acrílico y etilenglicol-acrílico	Acrílico	0-500	896.77	1526.50	0.9988	
	Etanol		1071.3	-1825.96	0.9981	
	Acetato		524.29	1362.01	0.9963	
	Propionato		897.18	4582.59	0.9913	
Acrílico y acrílico-etanol	Acrílico	0-1000	965.51	1729.7	0.9955	
	Etanol		1071.3	1823.96	0.9981	
	Acetato		524.29	1362.06	0.9963	
	Propionato		897.18	4582.59	0.9913	
Reactor Acrílico-metanol y acrílico-butanol	Acrílico	0-1000	965.51	1729.69	0.9951	
	Metanol		0-400	359.89	323.89	0.9999
	Butanol		0-400	926.68	600.27	0.9999
	Acetato		0-600	410.68	2908.39	0.9988
	Propionato		0-600	647.77	1901.59	0.9998
	Butirato	0-600	734.23	1487.4	0.9998	
	Acrílico	0-1000	541.17	1065.29	0.9999	

Temperatura de la columna, 1.5 min a 80°C, 50°C hasta 120°C (mantener durante 2 min). Inyector y detector 130 y 150°C, respectivamente. y = unidades de área, m = unidades de área/mg·L⁻¹, x = mg·L⁻¹ y b = unidades de área.

5.3.4. Identificación de compuestos formados en el reactor RE

Durante la operación del reactor RE, algunos intermediarios producidos como etil acrilato, 2-propen-1-ol y 1-propanol se identificaron por cromatografía de gases con detector de masas. Esto se realizó colocando 5 ml del efluente del reactor en frascos serológicos de 13 mL con 2 g de cloruro de sodio, se taparon con septos de plástico y arillos de aluminio. Una columna empacada de fibra de vidrio se introdujo a través del septo y permaneció en contacto con la fase gas de la muestra durante 30 minutos a una temperatura de 35 °C, para que los compuestos contenidos en la muestra se volatilizaran y adsorbieran en la fibra. Posteriormente ésta se retiró y se inyectó en un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard 5890) acoplado a un detector de masas, dejándose desorber por 5 minutos. La columna utilizada fue HP-FFAP, la temperatura inicial fue de 35 °C por 5 min., aumentando 10 °C por minuto hasta alcanzar 150 °C. Las temperaturas del inyector y detector fueron de 220 y 280 °C, respectivamente.

Los picos obtenidos se identificaron a través de la biblioteca de compuestos químicos del equipo. En donde el primero, con un tiempo de retención (TR) de 9.20 min correspondió al 1-propanol, con una similitud del 91%. El segundo con un TR de 10.3 min fue para el etil acrilato con una similitud del 81% y el tercero con un TR de 11.75 min correspondió a 2-propen-1-ol, con una similitud del 94%.

III. BIODEGRADACIÓN DE ALCOHOLES Y ÉSTERES EN LOTE

1. Antecedentes

La bioquímica de la transformación anaerobia del metanol a metano y bióxido de carbono ha sido ampliamente reportada (Keltjens y Vogels, 1993 y Müller *et al.*, 1993). En estudios en lote $1408 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($2.1 \text{ gDQO}\cdot\text{L}^{-1}$) de este compuesto requirieron 14 días para ser transformados hasta metano, alcanzando una producción de $1.8 \text{ gDQO}\cdot\text{CH}_4\cdot\text{L}^{-1}$, resaltando que, la adición de cobalto disminuyó a cuatro días el tiempo de degradación; la K_s de metanol encontrada para bacterias metilotrofas y acetogénicas fue de 8 y $512 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente (Florencio *et al.*, 1994). Existen otros reportes que corroboran que el utilizar cobalto y níquel como suplementos mejoran la degradación de este compuesto (Florencio *et al.*, 1993; Florencio *et al.*, 1994). Así también la adición continua de ambos metales a una velocidad de $0.05\text{-}0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$ (1 y $4 \mu\text{M}$, respectivamente) aceleran la producción de metano alcanzando aproximadamente $350 \text{ mgDQO}\cdot\text{CH}_4\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (Gonzalez-Gil *et al.*, 1999).

Por otra parte, Widdel (1986) reportó que de 20 mM y 100 mM (1200 y $6000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) de isopropanol, alrededor de 15 y 58 mM se consumieron, de los cuales el 90 y 92% respectivamente se recuperaron como acetona, encontrando que por cada mM de isopropanol consumido se formaron de 0.24 a 0.26 mM de metano. Fox y Ketha (1996), mostraron que en concentraciones de 0.5 hasta $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ la máxima conversión a metano fue de 11.5%; en ambos estudios la escasa producción de metano se debió a la formación de acetona. Platen y Schink (1987), mostraron que 10 mM ($580 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) de acetona se degradaron completamente hasta metano y CO_2 en un lapso de 28 a 30 días.

Por otro lado, Dwyer y Tiedje (1983), reportaron que la degradación de 40 mM de etilen glicol rindieron 20 mM de acetato y 20 mM de etanol y este último fue transformado a acetato que se acumuló, el metano producido (10 mM) fue a partir del H_2 formado de la oxidación del etanol.

En contraste, la biodegradación de ésteres del ácido acético ha sido escasamente reportada, el metil y el etil acetato no causaron reducción de la actividad metanogénica, por lo que fueron considerados no tóxicos o fácilmente biodegradables (Chou *et al.*, 1978a; Shelton y Tiedje, 1984). La hidrólisis del isopropil acetato puede ser realizada bajo

condiciones anaerobias (Fox y Ketha, 1996), mientras que la degradación de anhídrido acético no ha sido probada.

La degradación de ácido acrílico ha sido estudiada mayormente en anaerobiosis, ya que la degradación aerobia produce volatilización y malos olores (Dohányos *et al.*, 1988). No obstante, se ha encontrado que es tóxico a la metanogénesis acetoclástica con una CI_{50} de $0.86 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Chou *et al.*, 1978a), estudios posteriores reportan valores de 200 y $60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Speece, 1996; Demirer y Speece, 1998). Qu y Bhattacharya (1996) reportaron que en cultivos no aclimatados, el ácido acrílico inhibe parcialmente la degradación de acetato y completamente la de propionato. El coeficiente de inhibición (K_I) obtenido de un modelo de inhibición competitiva para el cultivo de acetato fue de 4.2 mg de acrílico $\cdot\text{L}^{-1}$. Mientras que, en cultivos enriquecidos con acetato, propionato o glucosa, las constantes k y k_s para la degradación de ácido acrílico fueron de 0.22, 0.40 y 1.2 d^{-1} y 7.2, 16,8 y $22.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Por otro lado, la degradación en continuo de una mezcla de metil, etil y butil acrilato usando acetato como co-sustrato fue eficientemente realizada (Dohányos *et al.*, 1988).

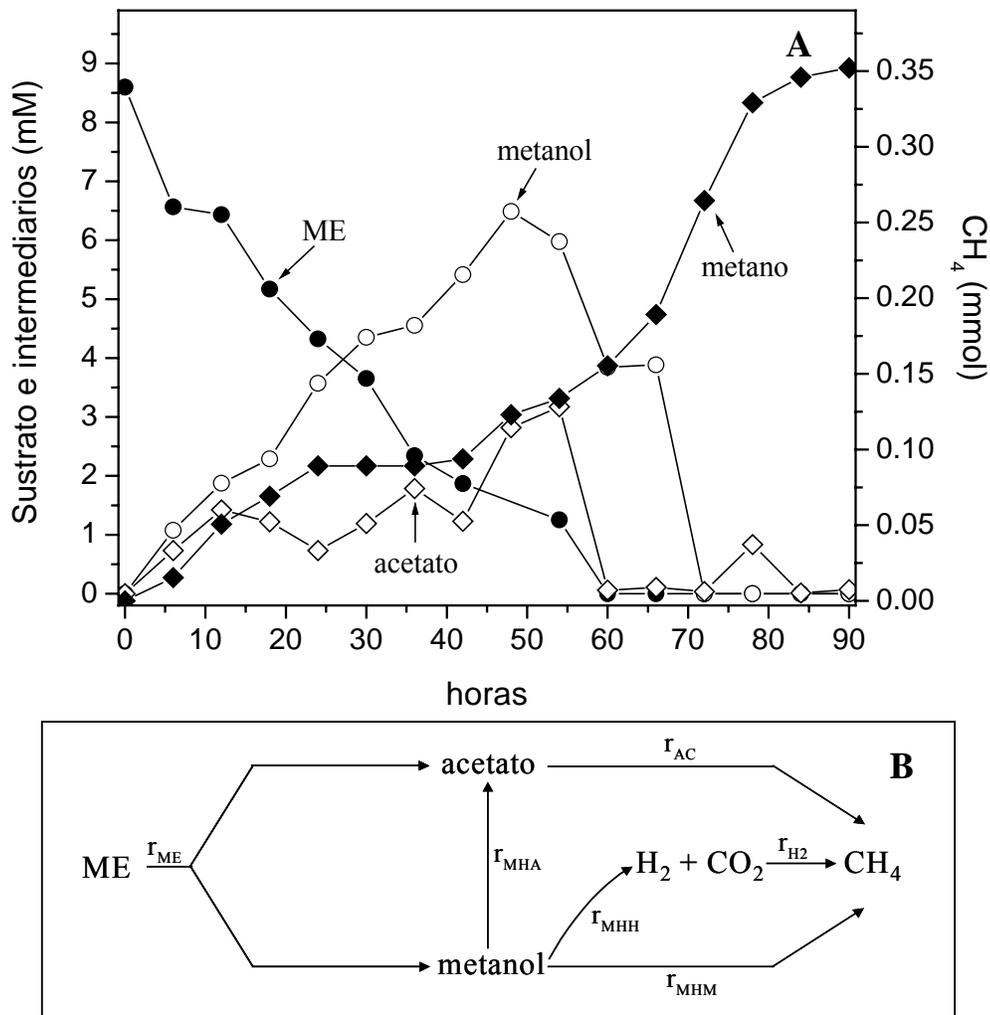
En general en la literatura, la degradación de la mayoría de los compuestos ha sido enfocada a conocer los niveles de remoción y poco se ha reportado acerca de los intermediarios que se forman y de que manera aceleran o limitan su degradación, además de que la mayoría de los estudios se han realizado para compuestos individuales, aunque en muchas aguas residuales estos pueden encontrarse mezclados. Por lo que en este capítulo se presentan los resultados de la biodegradación en lote de alcoholes, ésteres del ácido acético y ésteres del ácido acrílico, a través del seguimiento de cada uno de los sustratos, de la identificación e interacción de sus intermediarios, de las velocidades específicas de consumo de sustratos y producción de metano. Así también se presenta la concentración a la que cada una de las mezclas de compuestos causó toxicidad sobre la metanogénesis acetoclástica.

2. Resultados y discusión

2.1. Biodegradación de compuestos por separado

a) Metil acetato (ME)

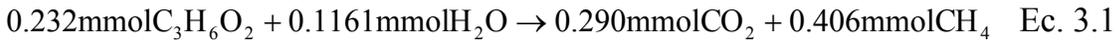
La Figura 3.1a, muestra la cinética de degradación de metil acetato (ME). Para interpretarla nos podemos ayudar de la Figura 3.1b, que indica que el ME se hidroliza a acetato y metanol (r_{ME}). Posteriormente el acetato se transforma a metano y CO_2 (r_{AC}), mientras el metanol se acumula.



Figuras 3.1a y b. Descomposición consecutiva de ME con formación de metanol y acetato como intermediarios.

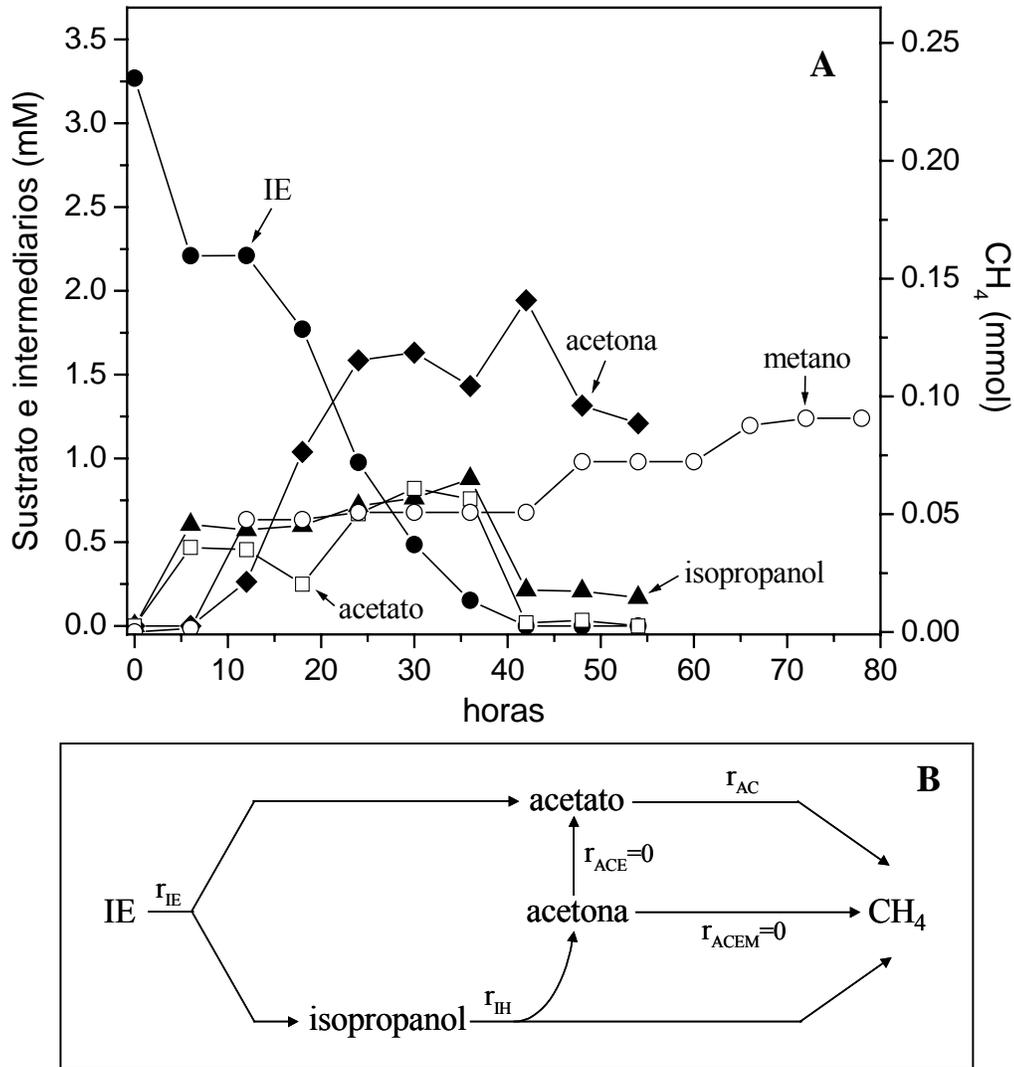
Una vez que el acetato se consume, el metanol empieza a reducirse a metano por la reacción r_{MHM} , ya que su ΔG° es mas favorable que el de las reacciones r_{MHA} y r_{MHH} (Tabla 1.4), además de que la k_s de la reacción metilotrofa (r_{MHM}) es 64 veces menor que la de las

bacterias acetogénicas (Florencio *et al.*, 1994). Con base en la reacción estequiométrica de Tarvin y Buswell (1934), la producción de metano fue del 87% (ecuación 3.1).



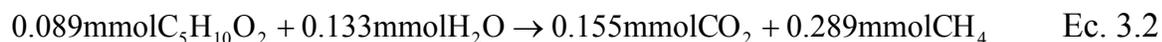
b) Isopropil acetato (IE)

Las Figuras 3.2a y 3.2b, muestran la hidrólisis del IE para formar acetato e isopropanol (r_{IE}), este último transformado consecutivamente en acetona con producción de metano (r_{IH}), de acuerdo a la reacción de Widdel (Tabla 1.4). Las primeras reacciones se llevaron a cabo rápidamente, mientras que la acetona se acumuló aparentemente sin inhibir las reacciones r_{ACE} Y r_{ACEM} .



Figuras 3.2a y b. Degradación consecutiva de isopropil acetato a metano con la formación de intermediarios como acetato, isopropanol y acetona.

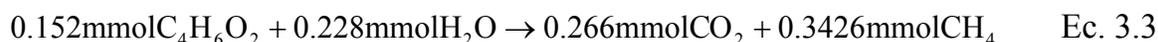
El metano producido fue de 0.086 mmol que corresponde a una recuperación del 32% de acuerdo a la ecuación 3.2 y provino principalmente del acetato (r_{AC}) y del isopropanol (r_{IH}) dado que la acetona no se degradó (r_{ACEM} y $r_{ACE}=0$).



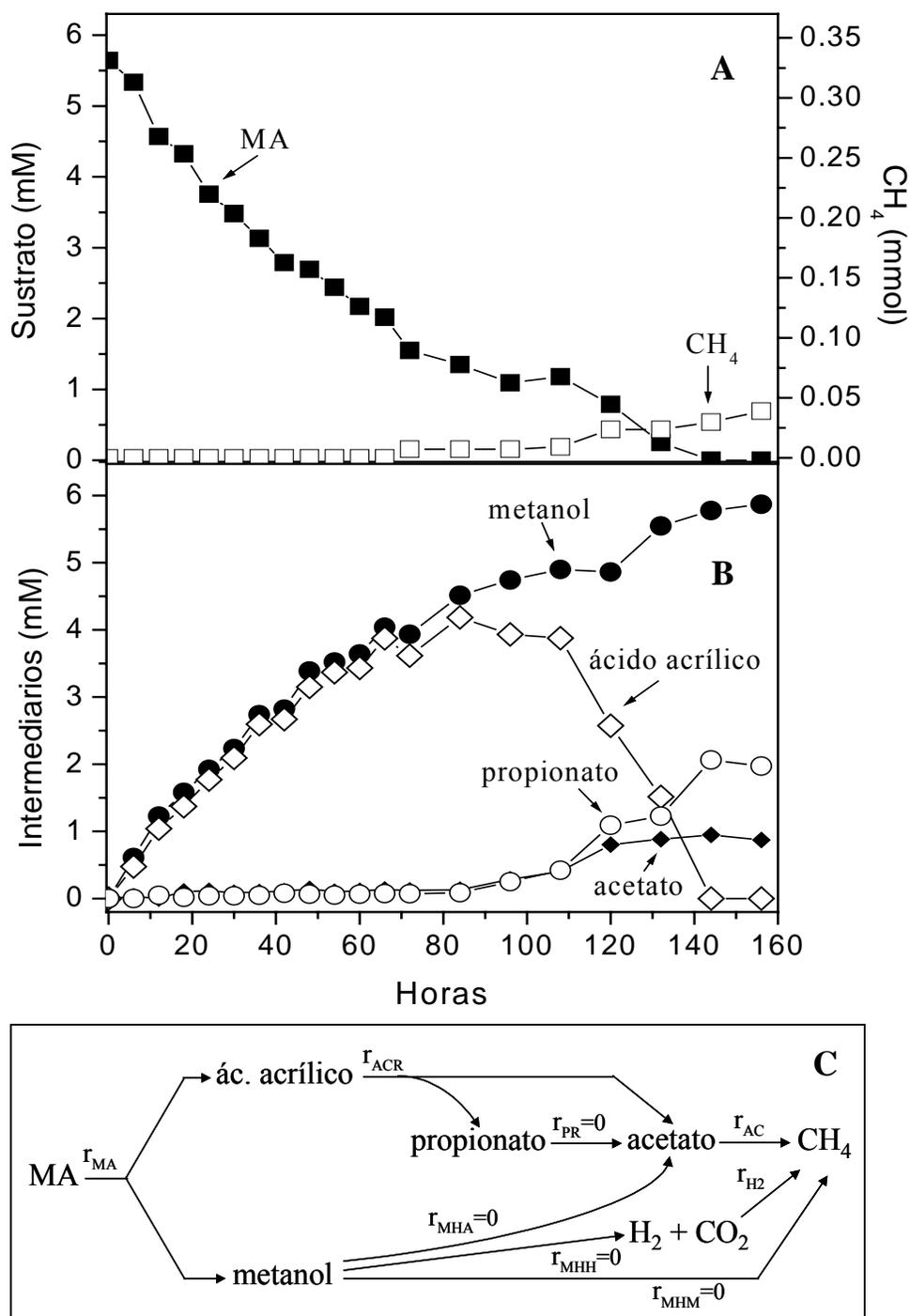
c) Metil acrilato (MA)

La Figura 3.3a, muestra que el MA se hidrolizó formando metanol y ácido acrílico (ver Figura 3.3b y c) y que este último pudo haber causado la inhibición de las tres reacciones involucradas en la degradación del metanol.

Posteriormente a partir del ácido acrílico se formó propionato y acetato (r_{ACR}) para este último transformarse parcialmente a metano (r_{AC}). Debido a que el metanol, propionato y una fracción del acetato permanecieron sin degradarse, el metano formado sólo fue del 11% de acuerdo a la ecuación 3.3.



El acetato es el sustrato precursor de la metanogénesis acetoclástica con un ΔG° favorable (Tabla 1.2), el propionato también es degradado aunque requiere del sintrofismo con bacterias que eliminan el H_2 para que la reacción involucrada en su transformación se vuelva espontánea (Tabla 1.2). En esta cinética el acetato fue inicialmente utilizado, mientras que el propionato no fue degradado, probablemente debido a una inhibición causada por el ácido acrílico sobre las reacciones r_{AC} y r_{PR} , tal como lo han reportado Chou *et al.* (1978a); Speece (1996); Qu y Bhattacharya (1996); Demirer y Speece (1998).

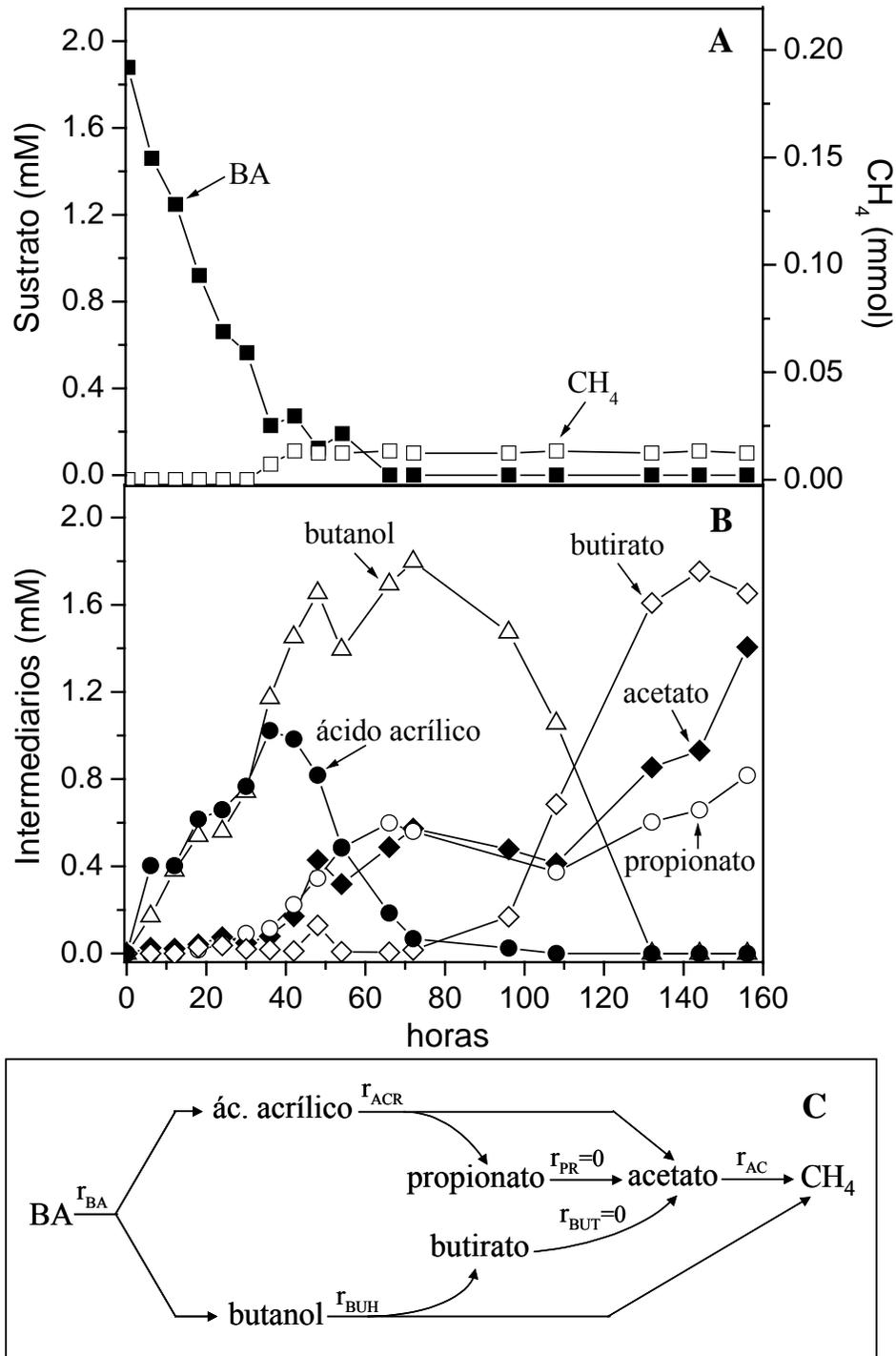


Figuras 3.3a, b y c. Degradación consecutiva de metil acrilato en diversos intermediarios y producción de metano.

d) Butil acrilato (BA)

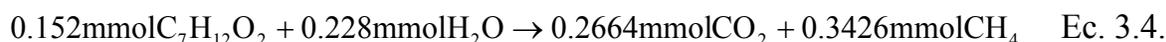
Como se observa en las Figuras 3.4a, b y c, el butil acrilato también fue hidrolizado fácilmente en ácido acrílico y n-butanol (r_{BA}), transformándose el primero en propionato y

acetato (r_{ACR}), mientras que el segundo inició su transformación a butirato (r_{BUH}) hasta que se agotó el ácido acrílico, lo que ocurrió de acuerdo a la reacción propuesta por Eichler y Schink (Tabla 1.4), y que finalmente no se transformó en acetato ($r_{BUT}=0$). El propionato posteriormente no se consumió.



Figuras 3.4a, b y c. Hidrólisis de BA, formación de intermediarios y producción de metano.

El metano formado pudo haber provenido inicialmente de la acetoclastia aunque posteriormente la reacción fue inhibida, por lo que el obtenido de acuerdo a la ecuación 3.4 fue de un 5%.



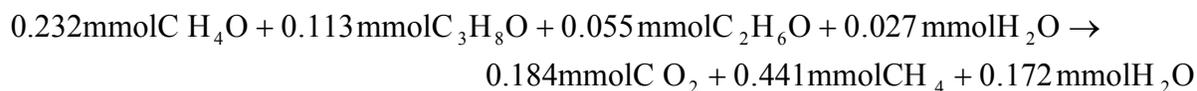
La baja producción de metano para ambos ésteres (MA y BA) fue debida a la toxicidad causada por el ácido acrílico ya que las concentraciones producidas a partir de la hidrólisis (406.6 y 134.7 mg·L⁻¹, respectivamente) se encontraron por arriba de los valores de CI₅₀ (200 y 60 mg·L⁻¹) reportados por Speece (1996) y Demirer y Speece (1998).

2.2. Biodegradación de mezclas

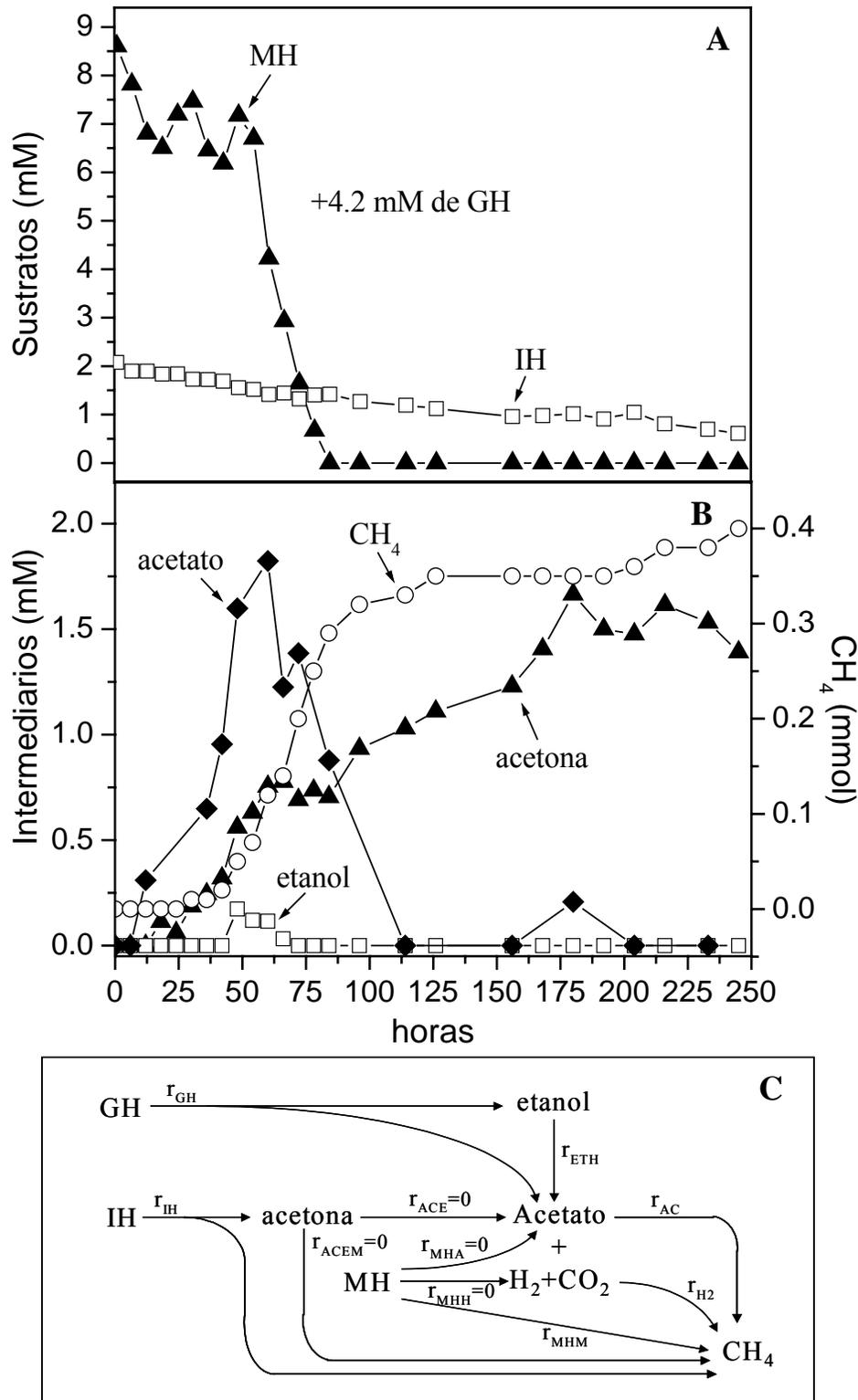
a) Alcoholes

Los alcoholes alimentados en mezcla, siguieron una cinética de degradación compleja como se muestra en las Figuras 3.5a, b y c. El etilenglicol (GH) no se siguió por cromatografía, no obstante a través de los intermediarios se observa que se transformó en acetato y etanol (r_{GH}), consecutivamente este último se convirtió rápidamente en acetato, hidrógeno y CO₂ (r_{ETH}) que a su vez se transformaron en metano (r_{AC} y r_{H2}). La degradación de metanol (MH) presentó una fase lag y subsecuentemente sufrió una rápida transformación a metano por bacterias metilotrofas (r_{MHM}), coincidiendo su consumo con la utilización del acetato (r_{AC}). El isopropanol (IH) se transformó casi completamente en acetona y metano (r_{IH}), sin embargo, la acetona no se consumió (r_{ACE} y $r_{ACEM}=0$).

La producción de acetato e hidrógeno (r_{GH} y r_{ETH}) sumado al rápido consumo de metanol y la constante transformación de isopropanol a acetona, llevaron a una acelerada formación de metano que representó el 91% de acuerdo a la ec. 3.5.



Ec. 3.5



Figuras 3.5a, b y c. Alcoholes probados en mezcla; hidrólisis, formación de intermediarios y producción de metano.

De acuerdo a los intermediarios formados, el GH siguió el mecanismo sugerido por Dwyer y Tiedje (1983) y el tiempo de formación de los intermediarios también fue similar al encontrado por estos autores. A pesar de que las enzimas involucradas en la degradación del metanol son constitutivas (Keltjens y Vogels, 1993) y las reacciones de acetogénesis o metilotrofia son energéticamente favorables (Tabla 1.4), la degradación de metanol presentó una fase lag y después alcanzó una velocidad específica de consumo alta (Tabla 3.1).

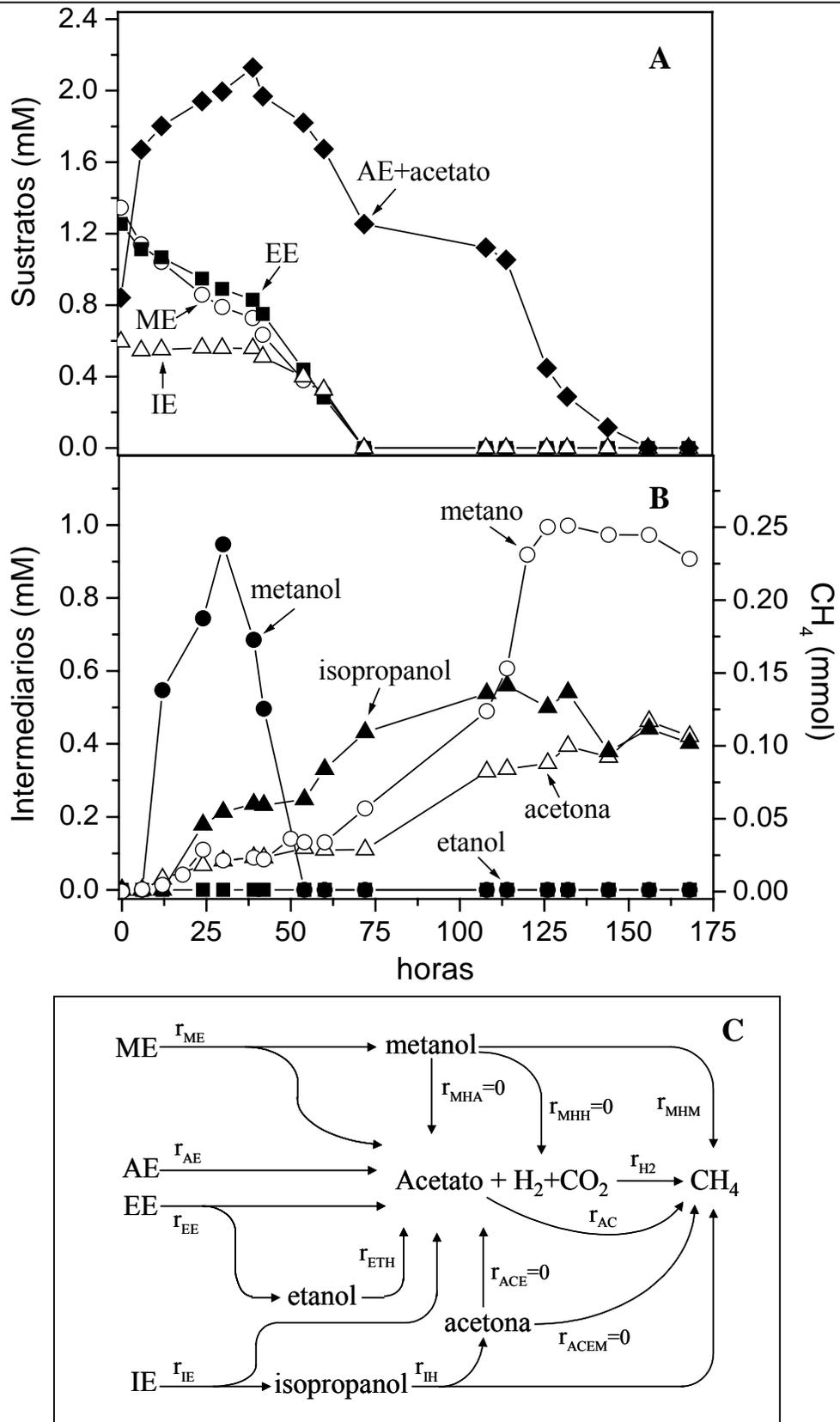
Las reacciones de degradación del isopropanol y de la acetona son energéticamente favorables (Tabla 1.4). Pero se ha encontrado que los microorganismos requieren un periodo de adaptación para que la acetona pueda ser convertida a metano (Platen y Schink, 1987). En esta mezcla la velocidad específica de transformación del isopropanol fue baja (Tabla 3.1) y una fracción no se transformó.

Tabla 3.1. Comparación de la velocidad específica de consumo o hidrólisis entre compuestos correspondientes a cada mezcla.

Mezcla	Nomenclatura	Alimentado (gDQO·L ⁻¹)	Velocidad específica de consumo/hidrólisis (gDQO·gSSV ⁻¹ ·d ⁻¹)
Alcoholes	GH	n.d	n.d
	MH	0.413	0.029
	IH	0.298	0.002
Ésteres de acetato	ME	0.151	0.007
	EE	0.201	0.011
	IE	0.124	0.013
	AE	0.108	0.004
Ésteres de acrilato	AA	0.291	0.029
	MA	0.244	0.005
	BA	0.181	0.023

b) Ésteres del ácido acético

En las Figuras 3.6a, b y c, se muestra la degradación de la mezcla de ésteres del ácido acético alimentada así como la interacción de los sustratos e intermediarios y las vías que siguen para transformarse en metano.



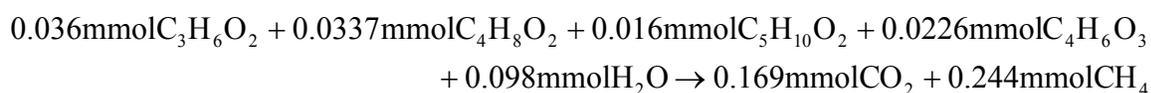
Figuras 3.6a, b y c. Perfil de consumo de la mezcla de ésteres del ácido acético, subproductos y productos formados.

El metil (ME) y etil acetato (EE) se hidrolizaron al mismo tiempo (r_{ME} y r_{EE}), siguiendo patrones similares, produciendo metanol, etanol y acetato.

El metanol se acumuló por un corto tiempo y posteriormente se transformó a metano (r_{MHM}). El etanol se transformó inmediatamente en acetato con producción de H_2 y CO_2 (r_{ETH}). El isopropil acetato (IE) presentó una fase lag antes de la hidrólisis para formar acetato e isopropanol (r_{IE}). Posteriormente, el isopropanol se transformó parcialmente en acetona y metano (r_{IH}), la que permaneció sin una conversión posterior.

El anhídrido acético (AE) y el acetato se detectaron juntos. El primero se hidroliza para formar acetato (r_{AE}), el cual se acumuló a partir de la hidrólisis de los otros ésteres y del etanol. Posteriormente, iniciaron el consumo presentando la menor velocidad específica (ver Tabla 3.1). En una prueba adicional con anhídrido acético como único sustrato (cinética no mostrada), se corroboró que la baja velocidad específica fue debida a la lenta hidrólisis de este compuesto, siendo de $0.003 \text{ gDQO} \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, similar a la encontrada cuando en la mezcla se consumieron juntos.

La velocidad específica de hidrólisis fue ligeramente mayor para el IE, seguido del EE y ME (Tabla 3.1). El metano producido en la mezcla alcanzó el 93% (ec. 3.6), la mayor parte derivado del acetato (r_{AC}), una menor parte del metanol (r_{MHM}), aunque también se pudo haber formado del H_2 (r_{H_2}).



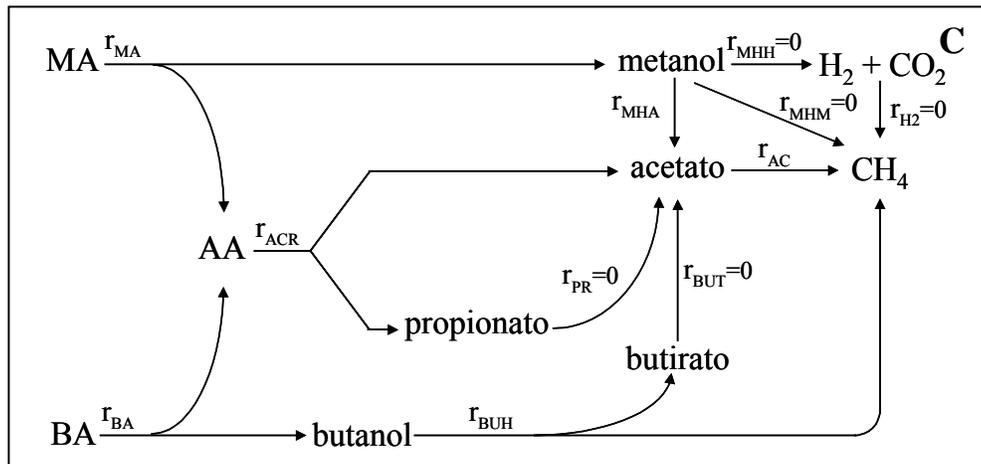
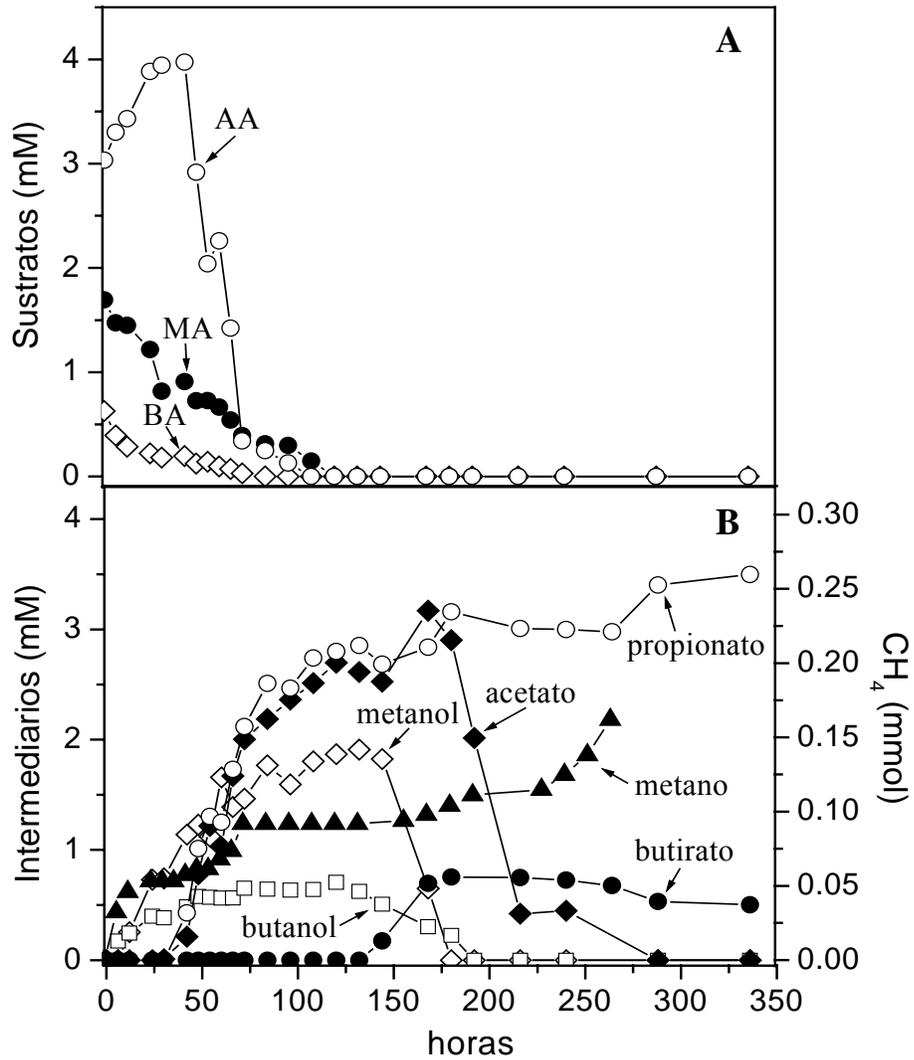
Ec. 3.6.

Similar a lo encontrado por Chou *et al.* (1978a) y Shelton y Tiedje (1984), el EE y ME y sus intermediarios fueron fácilmente degradados. La degradación del isopropanol y la acetona resultaron ser el paso limitante para alcanzar la completa biotransformación a metano en esta mezcla (Fox y Ketha, 1996).

c) Ésteres del ácido acrílico

La degradación de los ésteres del ácido acrílico alimentados en mezclas se muestra en las Figuras 3.7a, b y c. Como se observa, el metil acrilato (MA) se hidrolizó produciendo ácido

acrílico y metanol (r_{MA}), este último se transformó en acetato aparentemente por la reacción r_{MHA} , después de haberse acumulado por un periodo largo.



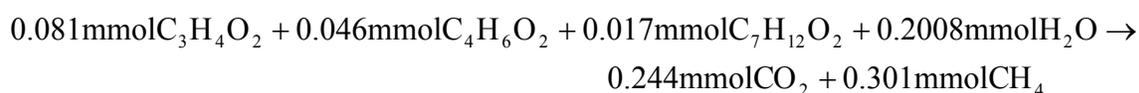
Figuras 3.7a, b y c. Hidrólisis de la mezcla de ésteres del ácido acrílico, formación de intermediarios y producción de metano.

El butil acrilato (BA) se hidrolizó rápidamente dando ácido acrílico y butanol (r_{BA}), el butanol se oxidó produciendo ácido butírico (r_{BUH}), que durante un largo periodo no se consumió, al final del experimento se observó un ligero consumo que coincidió con un incremento en la concentración de propionato, la mayor parte del butirato no se transformó en acetato ($r_{BUT}=0$).

El ácido acrílico (AA) alimentado y el proveniente de sus ésteres se acumuló y no se consumió hasta que estos se hidrolizaron parcialmente, produciendo acetato y propionato (r_{ACR}). El acetato generado en esta etapa además del proveniente del metanol se acumuló, aparentemente debido a una inhibición temporal causada por el ácido acrílico, después de ese periodo fue transformado a metano (r_{AC}). Mientras que el consumo de propionato, fue inhibido completamente ($r_{PR}=0$).

Comparando las velocidades específicas de consumo de los componentes de esta mezcla, no obstante que el metil y butil acrilato iniciaron la hidrólisis, la mayor velocidad la presentó el ácido acrílico (Tabla 3.1). Probablemente la velocidad en los ésteres fue disminuida por la presencia de este mismo, como se observó en las cinéticas de degradación de los compuestos separados.

El metano producido fue del 54% de acuerdo a la ecuación 3.7 y se originó principalmente del acetato y directamente de la oxidación del butanol.



Ec. 3.7.

El acetato y propionato formados a partir del ácido acrílico se encontraron en una relación molar 1:1 en esta cinética, mientras que Janssen (1991) para un cultivo puro encuentra una relación molar de 2:1. Kiene y Taylor (1989), sugieren que la concentración molar inicial de ácido acrílico influye en la relación; en lodos provenientes de sedimentos marinos alimentados a concentraciones milimolares la relación acetato:propionato es 1:1, mientras que a concentraciones mil veces menores es 1:2.

Dado que el acelerado consumo de metanol coincidió con el incremento final en la concentración de acetato, se sugiere que este se transformó por la reacción r_{MHA} , mecanismo

propuesto por Florencio *et al.* (1993). La degradación de butanol generado en estas condiciones también siguió el mecanismo reportado por Eichler y Schink (1984). Aunque la transformación de butirato produce generalmente acetato, el propionato también se reporta como un intermediario en la degradación de este ácido graso (Fang y Jia, 1999).

Qu y Bhattacharya (1996), encontraron que el ácido acrílico tiene un efecto inhibitorio mayor sobre las bacterias OHPA utilizadoras del propionato, que sobre las acetoclásticas utilizadoras del acetato. En este estudio, las bacterias acetoclásticas transformaron parcial o totalmente el acetato inhibiéndose temporalmente; mientras que las consumidoras de propionato presentaron una inhibición aparentemente irreversible. Además, la concentración de ácido acrílico ($385 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) en esta mezcla fue mayor a las concentraciones inhibitorias reportadas para bacterias metanogénicas. No se sabe si el retardo en el consumo del butirato responde a una inhibición de las bacterias utilizadoras del butirato por el ácido acrílico, o por la falta de adaptación del lodo para realizar la β -oxidación de este compuesto intermediario. Posteriormente se encontró que el retardo es debido a inhibición por toxicidad, como se muestra en el Capítulo V.

2.3. Comparación de la biodegradabilidad entre alcoholes, ésteres acéticos y ésteres acrílicos

La Tabla 3.2 presenta los coeficientes que indican el comportamiento cinético de las reacciones de degradación de los compuestos estudiados. La relación másica aplicada fue de alrededor de $0.1 \text{ gDQO}\cdot\text{gSSV}^{-1}$, excepto para los ésteres del ácido acético y para el butil acrilato que es poco soluble presentando alta volatilidad.

Por otra parte, como se muestra en la Tabla 3.2 en los ensayos de biodegradabilidad de compuestos alimentados como sustratos únicos, aunque los cuatro compuestos son ésteres y en términos de demanda química de oxígeno se alimentaron en concentraciones similares, la velocidad específica de hidrólisis fue más alta para los ésteres del ácido acético (metil e isopropil acetato) que para los ésteres del ácido acrílico (metil y butil acrilato), lo que indicó que intermediarios como el metanol e isopropanol afectaron menos la velocidad específica de hidrólisis que el ácido acrílico. La conversión de estos sustratos a metano fue alta sólo para el ME, ya que para el IE intermediarios como el isopropanol y la acetona no se

degradaron. En los acrilatos la inhibición del ácido acrílico sobre las bacterias consumidoras de acetato y de propionato llevó a los bajos niveles de formación de metano.

Tabla 3.2. Sustratos alimentados, relación másica inicial, velocidad específica de consumo y/o hidrólisis de sustratos, intermediarios producidos y velocidad específica de producción metano, en ensayos separados y mezclas.

	Mezcla Alcoholes	Ésteres del ácido acético		Ésteres del ácido acrílico			
		ME	IE	Mezcla	MA	BA	Mezcla
mgDQO _{alimentados} ·L ⁻¹	1046	962	680	582	812	541	716
^a gDQO·gSSV ⁻¹	0.12	0.11	0.08	0.07	0.09	0.06	0.08
^b mgDQO _{residual} ·L ⁻¹	178	0.0	179	112	558	444	471
CH ₄ producido (%)	91	87	32	93	11	5	54
mgDQO-CH ₄ ·L ⁻¹	953	835	215	541	92	29	384
LCH ₄ ·gDQO ⁻¹	0.32	0.30	0.10	0.32	0.04	0.02	0.19
^c gDQO·gSSV ⁻¹ ·d ⁻¹	0.023	0.051	0.049	0.032	0.014	0.032	0.039
^d gDQO-CH ₄ ·gSSV ⁻¹ ·d ⁻¹	0.039	0.029	0.007	0.022	0.0014	0.0006	0.003

^aRelación másica inicial. ^bComo intermediarios. ^cVelocidad específica de consumo y/o hidrólisis del sustrato (s). ^dVelocidad específica de producción de metano. Valor teórico: 0.35 L CH₄·gDQO⁻¹.

Con respecto a los compuestos alimentados en mezcla, en la Figura 3.8 y en la Tabla 3.2 se muestra que en términos de demanda química de oxígeno, la mezcla de acrilatos presentó una mayor velocidad específica de consumo, seguido de los acetatos y finalmente los alcoholes. Mientras que la mayor producción de metano se obtuvo en la mezcla de ésteres del ácido acético, seguido de los alcoholes y finalmente de los ésteres del ácido acrílico.

En la mezcla de ésteres del ácido acrílico, no obstante a presentar la mayor velocidad de hidrólisis (Tabla 3.2), una inhibición temporal de las bacterias utilizadoras de acetato y una inhibición irreversible de las bacterias consumidoras de propionato indujeron al bajo nivel de producción de metano, aunque mejoró respecto a cuando se alimentaron por separado, debido a que en la mezcla el metano producido a partir del acetato y el proveniente de la oxidación del butanol a butirato, contribuyeron a este incremento.

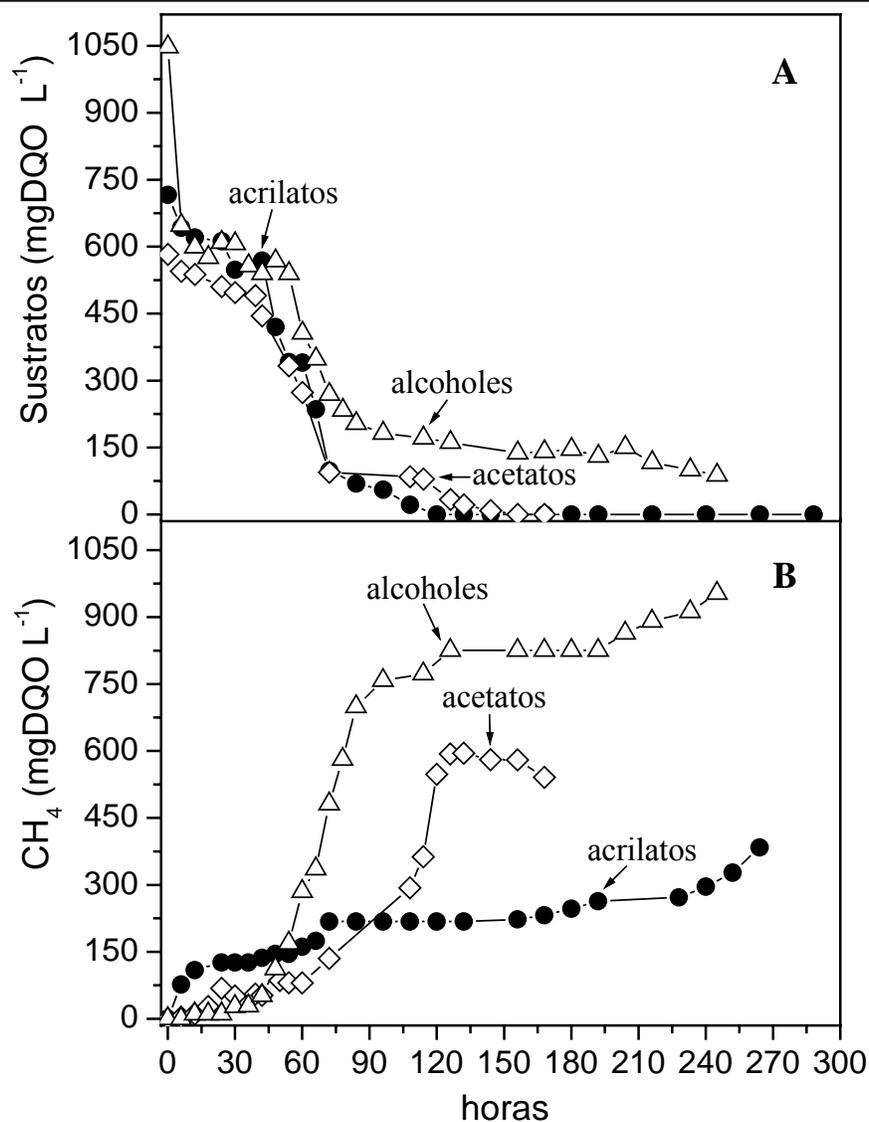


Figura 3.8. Patrón de consumo de las mezclas de ésteres del ácido acético, ésteres del ácido acrílico y alcoholes (A). Evolución de la producción de metano para cada mezcla de compuestos químicos (B).

En la mezcla de ésteres del ácido acético, la menor velocidad de hidrólisis fue debida al prolongado tiempo de hidrólisis del metil acetato y del anhídrido acético. En esta mezcla el intermediario directo de la mayoría de los sustratos fue el acetato, lo que llevó a una alta producción de metano. Sin embargo una fracción de intermediarios producidos como el isopropanol y la acetona no se degradaron.

En la mezcla de alcoholes la baja velocidad específica de consumo (Tabla 3.2), la causaron la lenta velocidad de transformación del isopropanol y la prolongada fase que el metanol presentó antes de su consumo. El metano producido fue alto ya que sustratos como

el etilenglicol, el metanol y sus intermediarios se consumieron totalmente. La fracción no degradada correspondió a la acetona proveniente del isopropanol.

En las mezclas de ésteres de ácido acético y de alcoholes, la presencia de otros ésteres o compuestos como el etilenglicol, el metanol y de intermediarios como el etanol y el acetato, no mejoraron la degradación del isopropanol y la acetona.

2.4. Toxicidad de la mezcla de compuestos sobre la metanogénesis acetoclástica

A partir de estas pruebas se determinó la concentración inhibitoria (CI_{50}), la cual se definió como la concentración de la mezcla de compuestos, alcoholes, ésteres del ácido acético o ésteres del ácido acrílico ($gDQO \cdot L^{-1}$), a la que la actividad metanogénica específica ($gDQO-CH_4 \cdot gSSV^{-1} \cdot d^{-1}$) disminuyó en un 50%.

a) Mezcla de alcoholes

Como se muestra en la Figura 3.9, concentraciones entre 1 y 3 $gDQO \cdot L^{-1}$ llevaron a un rápido decremento de la actividad metanogénica de un 100% hasta 65%. Los valores en el intervalo de concentración alta causaron una disminución paulatina hasta 30%. La CI_{50} encontrada fue de 16 $gDQO \cdot L^{-1}$ que correspondieron a 3.6, 4.2 y 2.2 $g \cdot L^{-1}$ de metanol, etilenglicol e isopropanol, respectivamente. Los alcoholes aparentemente resultaron ser más tóxicos a la metanogénesis acetoclástica en mezcla, ya que la CI_{50} para el metanol como único sustrato es de 22.0 $g \cdot L^{-1}$ y para 1-propanol 34 $g \cdot L^{-1}$ (Speece, 1996), la concentración inhibitoria para el etilenglicol no ha sido reportada.

b) Mezcla de ésteres del ácido acético

En la Figura 3.10 se observa, que con la mezcla de ésteres acéticos la actividad metanogénica específica presentó una disminución lineal hasta una concentración de 50 $gDQO \cdot L^{-1}$, en la que la actividad metanogénica fue reducida hasta 13%. A concentraciones por arriba de la anterior, la actividad metanogénica no fue suprimida. La CI_{50} fue de 19 $gDQO \cdot L^{-1}$ que correspondieron a 3.2, 2.6, 2.3 y 3.8 $g \cdot L^{-1}$ de metil, etil e isopropil acetato y

anhídrido acético, respectivamente. En la literatura no se reportan valores de CI_{50} para estos compuestos.

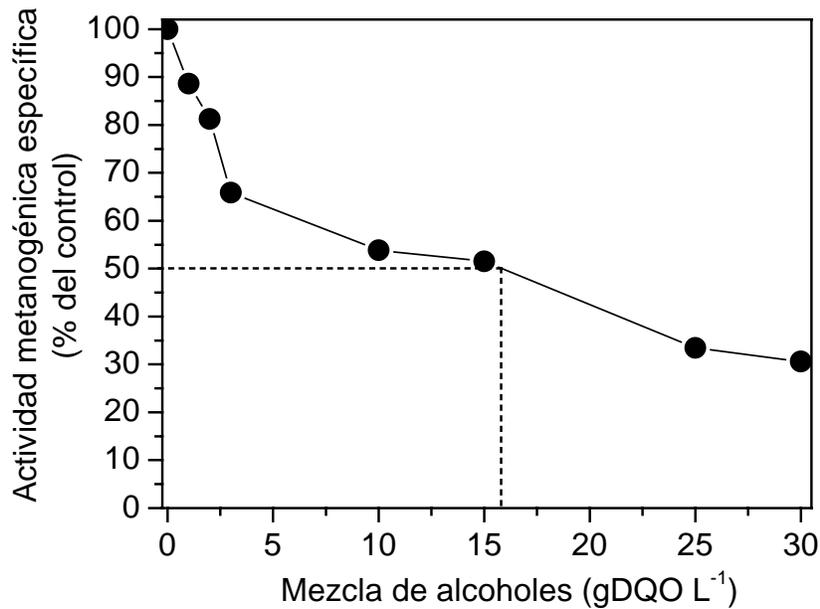


Figura 3.9. Concentración de la mezcla de alcoholes a la que se inhibió el 50% de la actividad metanogénica acetoclástica.

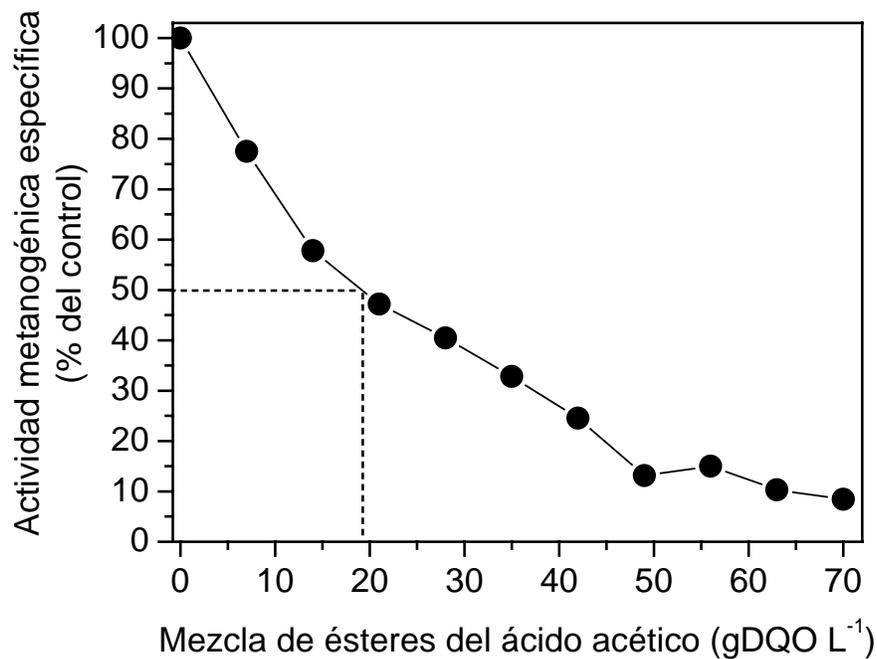


Figura 3.10. Concentración de la mezcla de ésteres del ácido acético a la que se inhibió el 50% de la actividad metanogénica acetoclástica.

c) Mezcla de ésteres del ácido acrílico

En la Figura 3.11 se muestra que concentraciones menores a $0.16 \text{ gDQO}\cdot\text{L}^{-1}$ causaron una ligera disminución de la actividad, sin embargo al duplicar esta concentración se presentó un decremento hasta 34%. A la concentración más alta a la que se expusieron las bacterias ($0.5 \text{ gDQO}\cdot\text{L}^{-1}$), la actividad metanogénica decreció a 22%. La CI_{50} para esta mezcla fue de $0.25 \text{ gDQO}\cdot\text{L}^{-1}$ y correspondió a 49, 37 y 63 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de metil acrilato, butil acrilato y ácido acrílico, respectivamente. Las concentraciones inhibitorias (CI_{50}) que se han reportado son $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para butil acrilato y $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para el ácido acrílico (Speece, 1996), lo cual indica que en mezcla estos compuestos son más tóxicos.

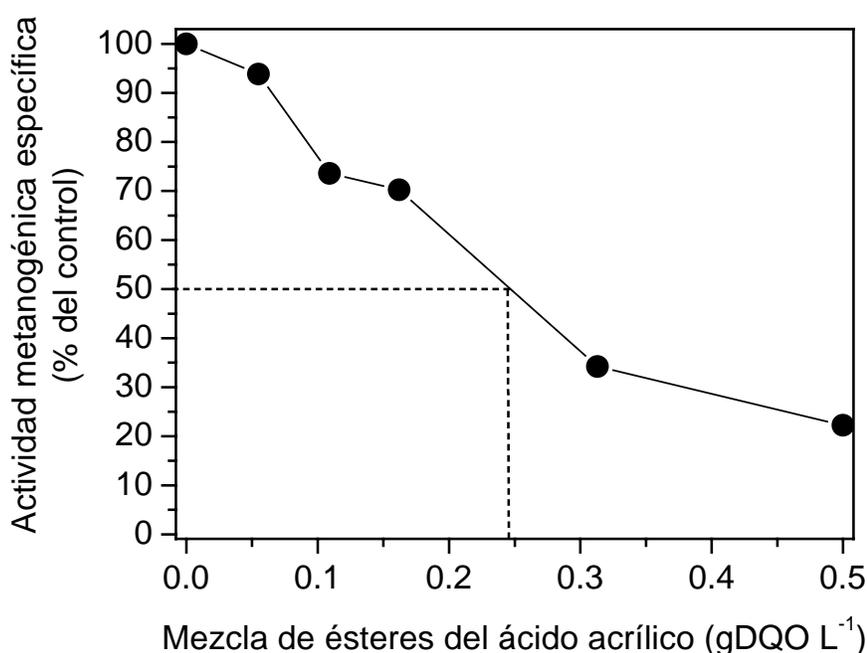


Figura 3.11. Concentración de la mezcla de ésteres del ácido acrílico a la que se inhibió el 50% de la actividad metanogénica acetoclástica.

En la Tabla 3.3 se muestra que las concentraciones iniciales en las pruebas de biodegradación para la mezcla de alcoholes y ésteres del ácido acético fueron 15 y 32 veces menores a la concentración inhibitoria encontrada para este lodo, lo que concuerda con sus altas velocidades específicas de producción de metano y sus niveles de metanización. Mientras que, para la mezcla de ésteres del ácido acrílico la concentración inicial fue tres veces mayor a la concentración inhibitoria, sin embargo en las pruebas de biodegradabilidad

la actividad metanogénica acetoclástica se recuperó, dejando ver nuevamente que hay un efecto más tóxico sobre las bacterias utilizadoras de propionato.

Tabla 3.3. Concentraciones iniciales en ensayos de biodegradación de mezclas de compuestos y concentración inhibitoria (CI_{50}).

Mezcla	Concentración en ensayos de degradación ($gDQO \cdot L^{-1}$)	CI_{50} ($gDQO \cdot L^{-1}$)
Alcoholes	1.046	16
Ésteres del ácido acético	0.582	19
Ésteres del ácido acrílico	0.716	0.25

3. Conclusiones

De los resultados obtenidos de la biodegradación de compuestos separados se concluye que los ésteres del ácido acético presentaron una mayor velocidad específica de hidrólisis (0.051 y 0.049 $gDQO \cdot gSSV^{-1} \cdot d^{-1}$) que los ésteres del ácido acrílico (0.014 y 0.032 $gDQO \cdot gSSV^{-1} \cdot d^{-1}$), aparentemente el ácido acrílico afectó negativamente esta reacción.

El metano producido a partir del ME, IE, MA y BA fue del 87, 32, 11 y 5% y la degradación de cada sustrato y sus intermediarios fue más rápida en el siguiente orden:

ME>acetato>metanol

IE> acetato>isopropanol>acetona

MA>ácido acrílico>acetato>metanol>propionato

BA>ácido acrílico>butanol> acetato> butirato>propionato

En las pruebas de biodegradación de mezclas de compuestos, la velocidad específica de hidrólisis y/o consumo fue mayor para la mezcla de ésteres del ácido acrílico, seguida de los ésteres del ácido acético y menor en la mezcla de alcoholes (0.039 , 0.032 y 0.023 $gDQO \cdot gSSV^{-1} \cdot d^{-1}$). Mientras que la mayor producción de metano se obtuvo en la mezcla de ésteres del ácido acético, alcoholes y ésteres del ácido acrílico (93, 91 y 54%).

La degradación de los sustratos e intermediarios en las mezclas fue más rápida en el siguiente orden:

Mezcla de alcoholes

Sustratos: GH>MH>IH

Intermediarios: Etanol>acetato>acetona

Mezcla de ésteres del ácido acético

Sustratos: IE>EE>ME>AE

Intermediarios: Etanol>metanol>acetato>isopropanol>acetona

Mezcla de acrilatos

Sustratos: AA>BA>MA

Intermediarios: AA>butanol>metanol>acetato>butirato>propionato

Por otra parte, para ésteres del ácido acético como el IE, la presencia de otros ésteres o compuestos como el metanol, etanol y acetato, no mejoraron la degradación de sus intermediarios (isopropanol y acetona).

Mientras que cuando se siguieron por separado los ésteres del ácido acrílico, tanto la velocidad de producción de metano como el porcentaje encontrado fueron muy bajos, mejorando cuando se adicionaron en mezcla, debido a la metanogénesis a partir del acetato y del metano producido de la oxidación del butanol a butirato. Sin embargo el efecto inhibitorio del ácido acrílico sobre las bacterias utilizadoras del propionato no se revirtió.

En las pruebas de toxicidad se encontró que la concentración de la mezcla de compuestos a las que la actividad metanogénica específica disminuyó en un 50% fue de 16, 19 y 0.25 gDQO·L⁻¹ para alcoholes, ésteres del ácido acético y ésteres del ácido acrílico, respectivamente.

En general, de las pruebas de biodegradabilidad y toxicidad se concluye que los alcoholes y ésteres del ácido acético en mezclas pueden ser considerados como compuestos de fácil degradación, excepto el isopropanol. Mientras que los ésteres del ácido acrílico como únicos sustratos o en mezcla son menos biodegradables ya que en lodos no adaptados a estos compuestos, bajas concentraciones causan toxicidad sobre grupos bacterianos clave que participan en el proceso de digestión anaerobia.

IV. DEGRADACIÓN EN CONTINUO DE LA MEZCLA DE COMPUESTOS

1. Antecedentes

Aguas contaminadas que contienen bajas concentraciones de mezclas de compuestos petroquímicos provenientes de operaciones de lavado y enjuagado de contenedores usados en su transportación, se descargan a cuerpos receptores sin tratamiento alguno.

En la actualidad existen una gran variedad de estudios sobre la degradación de metanol en procesos continuos. Florencio *et al.* (1993), reportó que en reactores alimentados con $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sin y con adición de cobalto la máxima remoción alcanzada fue del 50.6 y 99.7 %. Posteriormente, Bhatti *et al.* (1996), mencionan que cargas orgánicas volumétricas de $21 \text{ gDQO}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ pueden ser tratadas eficientemente hasta en un 80%, con una actividad metanogénica específica máxima de $2 \text{ gDQO}\cdot\text{CH}_4\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. Por otro lado, un reactor operado durante un periodo de 15 días a una concentración de $1400 \text{ mgDQO}\cdot\text{L}^{-1}$ sólo alcanzó eficiencias de remoción del 55%, obteniendo después de 28 días una actividad de $155 \text{ mgDQO}\cdot\text{CH}_4\cdot\text{SSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (Zandvoort *et al.*, 2002).

Otros alcoholes, como el isopropanol a una carga orgánica volumétrica de $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ en un CSTR, después de 90 días de aclimatación alcanzó una conversión a metano del 56% (Chou *et al.*, 1978b). Por otra parte, Dwyer y Tiedje (1983) encontraron que $2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de etilenglicol se transformaron a acetato y etanol en concentraciones equimolares y este último además produjo acetato e hidrógeno. Una bacteria marina aislada por Eichler y Schink (1985) creció a una carga de $0.62 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ produciendo los mismos intermediarios.

Los ésteres en general, al ser hidrolizados pueden posteriormente ser degradados y sus intermediarios en algunos casos resultan menos tóxicos que las moléculas originales. Compuestos como metil y etil acetato probados a una carga de $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ se metanizaron en un 96% (Chou *et al.*, 1978b); igualmente, concentraciones de etil acetato entre 200-1000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ se transforman a metano rápidamente (Schwartz, 1991). Por otra parte, reactores continuos aclimatados a ácido acrílico a una carga orgánica de $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, aún después de largos periodos sólo presentaron una degradación del 21% (Chou *et al.*, 1978b). Mientras que en un quimiostato suplementado con glucosa, se degradaron $0.416 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ de ácido acrílico, seis veces más que con un lodo adaptado a acetato (Qu y Bhattacharya, 1996). En reactores en serie $1.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ de este compuesto químico se transformaron eficientemente

hasta metano (Demirer y Speece, 1997). Por otro lado, una mezcla de metil, etil y butil acrilato probados en un reactor CSRT a concentraciones menores de $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y enriquecidos con $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido acético se removieron eficientemente hasta en 98% (Dohányos *et al.* 1988).

Para compuestos aromáticos, entre ellos los xilenos, se ha encontrado que concentraciones de 10 y $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ no inhiben la actividad metanogénica, sin embargo concentraciones de $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ resultan tóxicas (Schwartz, 1991). Por otra parte, se ha reportado que la máxima concentración de *orto*-xileno degradada después de 255 días de incubación fue de $0.21 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, caso contrario para *m* y *p*-xileno que permanecieron sin degradarse (Edwards *et al.*, 1994). Kleerebezem *et al.* (1999), encontraron que en un lapso de 500 días, $0.15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de *p*-xileno no fueron utilizados. Zheng *et al.* (2001), reportan que de 15 - $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de *orto*-xileno como único sustrato se degradaron lentamente (0.009 d^{-1}), en mezcla con otros compuestos aromáticos como el tolueno la velocidad de degradación incrementó a 0.026 y 0.046 d^{-1} , sugiriendo que las bacterias utilizan la misma enzima para la degradación de estos compuestos. Da Silva y Alvarez (2004), encontraron que de 2 a $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de este mismo compuesto, se degradaron eficientemente en columnas bioaumentadas con microorganismos que codifican para la enzima metilbencil-succinato sintetasa, que cataliza la adición de fumarato a uno de los grupos metilo lo que representa el primer paso en la degradación de compuestos aromáticos.

Por otra parte, concentraciones de estireno en un intervalo de 0.01 hasta $1.04 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ se transformaron a una gran variedad de intermediarios incluyendo ácidos grasos volátiles y CO_2 , sin embargo no se produjo metano (Grbić-Galić *et al.*, 1990). Posteriormente, Araya *et al.* (2000), mostró que en estudios en lote el 74% de $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de este aromático fue transformados a metano, pero cuando este provino de agua industrial en donde se encontraba a una concentración $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en mezcla con otros químicos, no se degradó, atribuyéndolo a la presencia de otros compuestos tóxicos como acrilatos y detergentes.

Como se señaló anteriormente, algunos alcoholes pueden ser rápidamente convertidos a metano, así como algunos ésteres del ácido acético. Mientras que los acrilatos y aromáticos son tóxicos y de difícil o nula biodegradación. Estos compuestos químicos debido a su origen, frecuentemente son descargados juntos. Por lo que, con la finalidad de proponer un

proceso de tratamiento estratégico que resulte sustentable, se realizó un estudio sobre la biodegradación anaerobia de la mezcla de catorce compuestos químicos en un reactor continuo. Así también se evaluó el efecto de la carga orgánica volumétrica sobre la eficiencia de remoción a través de la disminución del tiempo de retención hidráulico (TRH), determinando los compuestos que no se degradaron a TRH cortos.

2. Resultados y discusión

2.1. Adaptación del lodo del reactor a los 14 compuestos

Durante el arranque (Figura 4.1 a y b), el reactor se alimentó con MH alcanzando en 14 días eficiencias de remoción del 95%, con una producción de metano de $0.83 \text{ gDQO-CH}_4 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$.

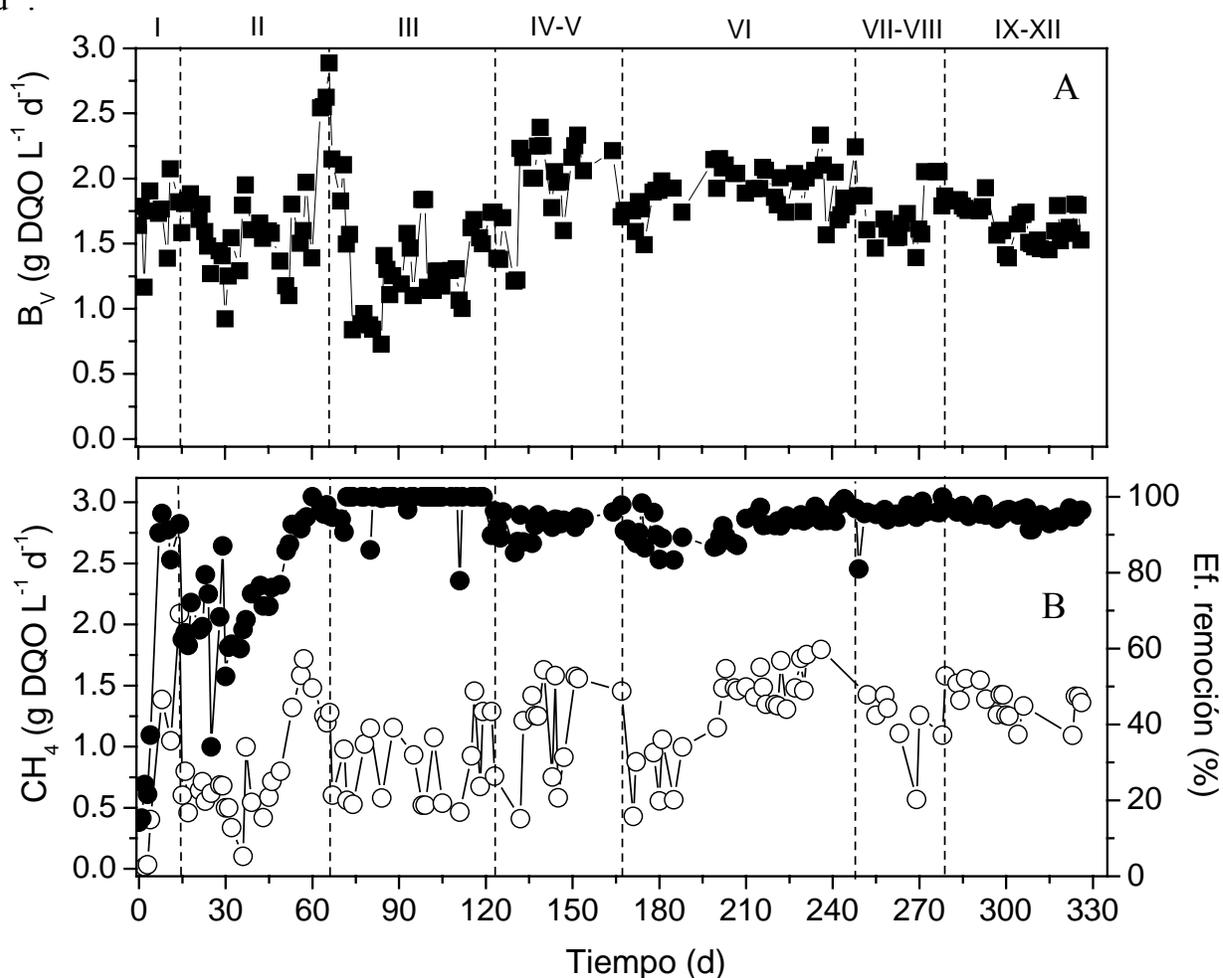


Figura 4.1. Desempeño del reactor durante la adición de cada uno de los compuestos. B_v (A); eficiencia de remoción y producción de metano (B). (■) Influyente; (●) remoción; (○) CH_4 .

En la etapa II se adicionó una mezcla de IH y AE, lo que llevó a una importante acidificación (Figura 4.2) que tuvo que ser amortiguada con la adición de bicarbonato de sodio ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) en la alimentación. La producción de metano decreció y la eficiencia de remoción cayó alrededor del 60%. Después de 43 días esta se recuperó alcanzando un 98% lo que indicó que el isopropanol fue transformado a acetona y la aclimatación a este intermediario requirió un tiempo de entre 28 a 35 días, similar a lo encontrado por Platen y Schink (1987). Al final de la etapa la adición de bicarbonato de sodio fue suspendida. Además, se descarta el efecto del anhídrido acético ya que es hidrolizado a acetato y posteriormente transformado a metano.

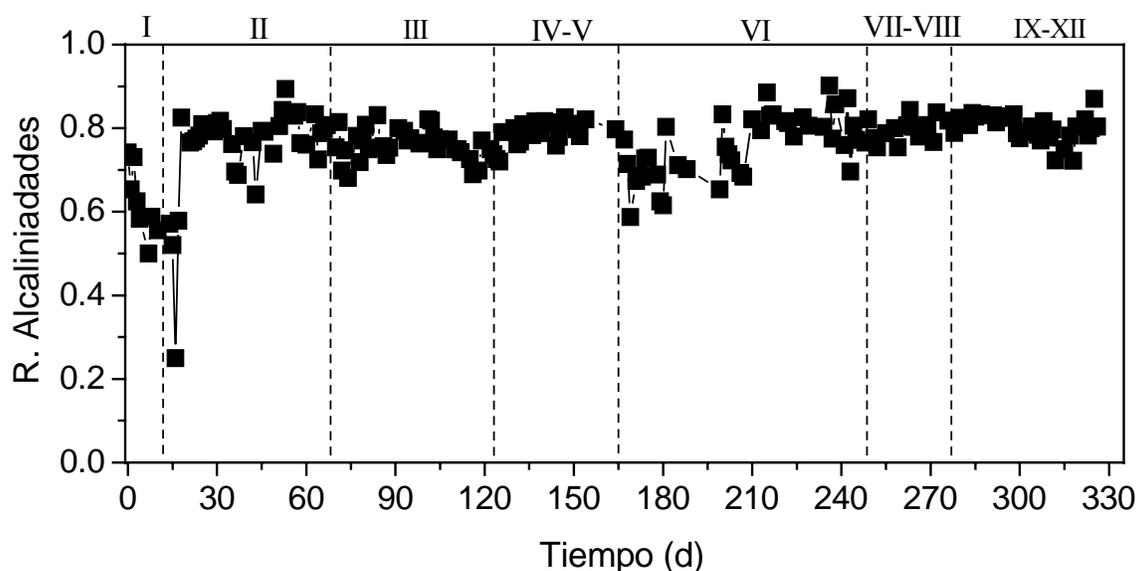
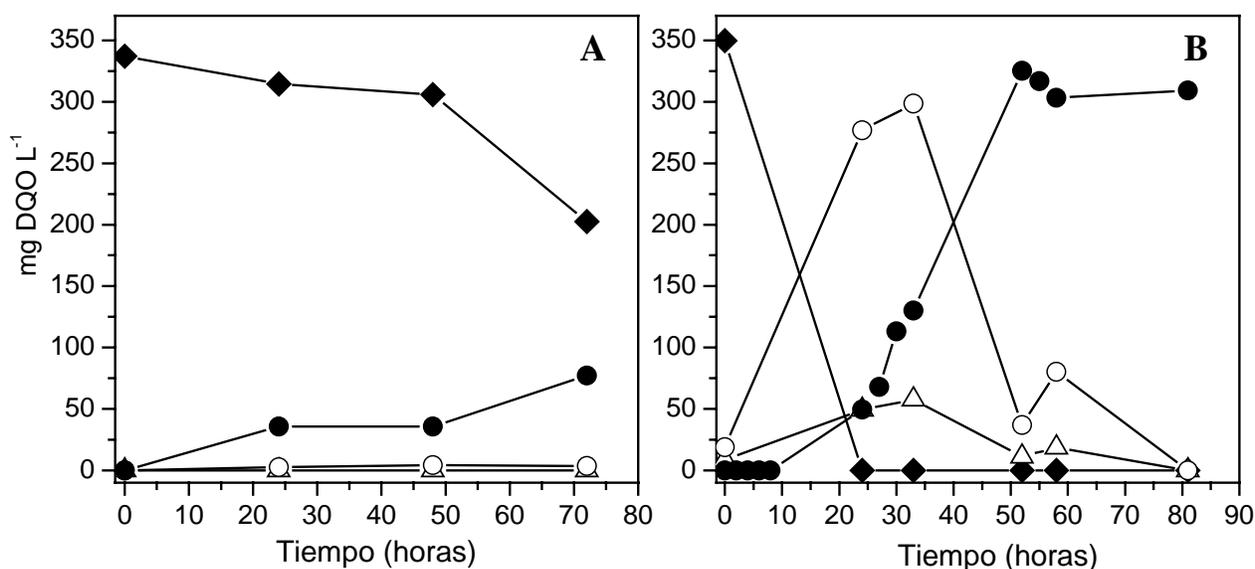


Figura 4.2. Evolución de la relación de alcalinidades durante la aclimatación a los compuestos.

La incorporación del BA en la etapa III no presentó un efecto negativo sobre el comportamiento del reactor. La adición de MA al inicio de la etapa IV hizo que la eficiencia de remoción bajara a un 85 % seguida de una rápida recuperación hasta un 92%. En esta etapa, 23% de la DQO total ($0.165 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) correspondió a ácido acrílico como intermediario. Cuando se adicionó a la mezcla el ME, alrededor del día 145, la remoción de DQO permaneció constante y la producción de metano incrementó ligeramente ($1.16 \text{ gDQO}\cdot\text{CH}_4\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$).

La adición del ácido acrílico en la etapa VI disminuyó la eficiencia de remoción hasta un 83% y también se presentó una pérdida en la granulación del lodo, llevando a un incremento en los sólidos suspendidos en el efluente de 25 hasta 46 mg·L⁻¹. En esta etapa, la concentración de ácido acrílico en la mezcla fue de alrededor de 0.214 g·L⁻¹, cercana al valor de CI₅₀ reportado (Speece, 1996). La mineralización de sus intermediarios acetato y propionato se inhibió provocando acidificación, en donde la relación de alcalinidad disminuyó de 0.78 hasta 0.58 (Figura 4.2) y nuevamente se adicionó bicarbonato de sodio. Después de 40 días el reactor se recuperó y la productividad promedio de metano fue de 1.31 gDQO-CH₄·L⁻¹·d⁻¹. La carga orgánica volumétrica de ácido acrílico en esta etapa fue más alta que la reportada de 16.7-66.7 mg·L⁻¹·d⁻¹ para un reactor metanogénico (Qu y Bhattacharya, 1996).

Al final de esta etapa, se realizaron pruebas de biodegradabilidad del ácido acrílico utilizando lodo no adaptado (control) y lodo aclimatado obtenido del reactor. Como se observa en la Figura 4.3a, en 72 horas con lodo no adaptado, sólo 40% de los 337.0 mgDQO·L⁻¹ adicionados se consumieron.



Figuras 4.3. Degradación de ácido acrílico con lodo no adaptado (A) y lodo adaptado en el reactor (B). (◆) Ácido acrílico; (△) acetato; (○) propionato; (●) CH₄.

Cuando se utilizó lodo adaptado, en una primera corrida, $71.4 \text{ mgDQO}\cdot\text{L}^{-1}$ se transformaron hasta metano en 24 horas alcanzando una actividad específica de $0.124 \text{ gDQO-CH}_4\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. Debido a la rápida degradación, el lodo se realimentó con una concentración cinco veces más alta, como se muestra en la Figura 4.3b, que se consumió completamente en 24 horas presentando una transformación primaria a propionato y en menor cantidad a acetato. Sin embargo la producción de metano inició hasta que todo el ácido acrílico se consumió, la actividad específica alcanzada fue de $0.025 \text{ gDQO-CH}_4\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. Este resultado mostró que el lodo adaptado a la mezcla de compuestos, fue capaz de degradar completamente el ácido acrílico, en un tiempo de adaptación menor a los reportados como único sustrato o con acetato como cosustrato (Demirer y Speece, 1999).

La adición de EE e IE en la etapa VII, no tuvieron un efecto negativo sobre la eficiencia de remoción, indicando una apropiada aclimatación a todos los compuestos adicionados antes. Además de que el EE se ha reportado como un compuesto de fácil degradación (Chou *et al.*, 1978a y Schwartz, 1991). También, el isopropanol y acetato proveniente de la hidrólisis fueron totalmente consumidos debido a la aclimatación de estos intermediarios en la etapa II.

En la etapa VIII (día 262), se adicionó el etilenglicol y se observó una inestabilidad en la producción de metano, aunque se ha reportado que este sustrato es fácilmente transformado a etanol, acetato e hidrógeno en reactores en lote y en continuo (Dwayer y Tiedje, 1983; Eichler y Schink, 1985). El valor promedio de productividad fue de $0.98 \text{ gDQO-CH}_4\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$.

Cuando PX, MX, OX y ST se adicionaron (etapas IX a XII), no se detectó ningún efecto negativo sobre la eficiencia de remoción la cual permaneció en 93%. En pruebas en lote utilizando como inóculo lodo obtenido del reactor en la etapa XII (Figura 4.4a), el *para*-xileno presentó un consumo mayor, mientras que, *meta* y *orto*-xileno mostraron un patrón similar. La producción de metano en los tres xilenos probados inició después de las 96 horas (Figura 4.4b).

Como se muestra en la Tabla 4.1, de los sustratos alimentados un porcentaje se consumió, indicando sólo una transformación primaria y aunque el *para*-xileno presentó la mayor velocidad y nivel de transformación, también se obtuvo la producción de metano más baja.

En general los tres fueron escasamente transformados a metano, similar a lo encontrado por Edwards *et al.* (1994); Kleerebezem *et al.* (1999) y Zheng *et al.* (2001).

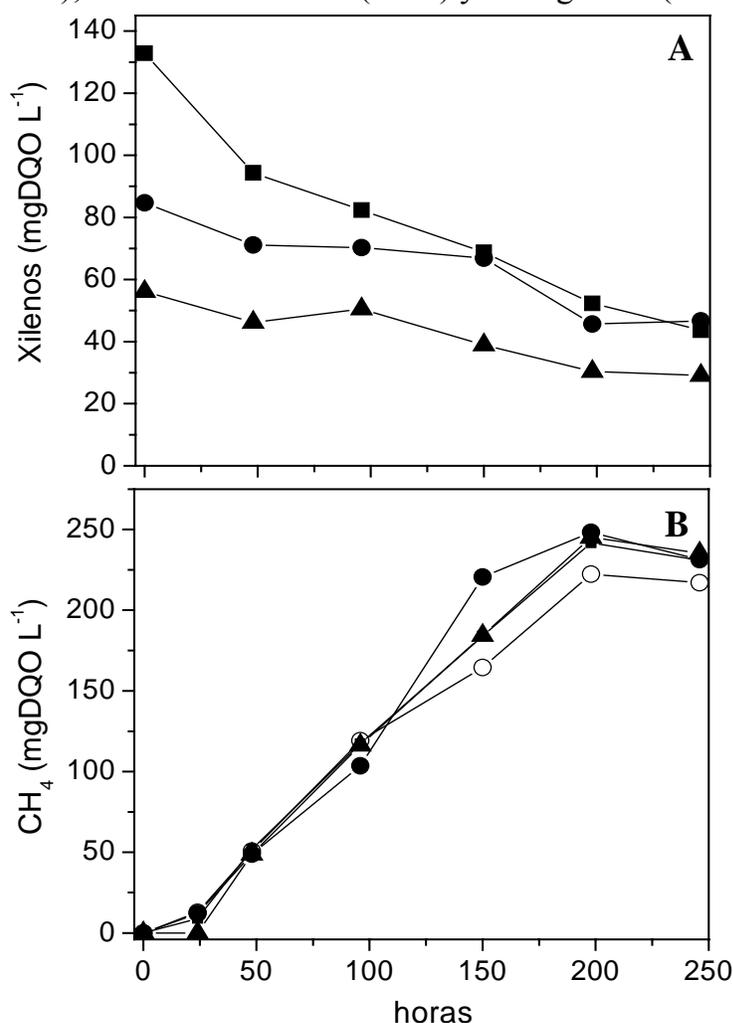


Figura 4.4. Patrón de degradación de xilenos (A); producción de metano con respecto al control (B). (○) Control; (■) *para*; (▲) *meta*; (●) *orto*.

Tabla 4.1. Velocidad de transformación y metanización de isómeros de xileno en ensayos en lote.

	Sustratos alimentados		Sustrato consumido (%)	Velocidad de consumo (mgDQO·L ⁻¹ ·d ⁻¹)	CH ₄ (%)
	(mg·L ⁻¹)	(mgDQO·L ⁻¹)			
<i>p</i> -xileno	41.9	132.9	67.1	6.2	13.3
<i>m</i> -xileno	17.7	56.1	48.1	4.6	36.4
<i>o</i> -xileno	26.7	84.6	44.8	3.6	37.9

Como se observa en la Figura 4.5, durante las primeras etapas los porcentajes de transformación de los compuestos hasta metano fueron bajos, pero conforme el reactor se aclimató a los diferentes compuestos la transformación aumentó manteniéndose en las últimas etapas alrededor del 80%. El metano experimental recuperado durante las primeras cinco etapas fue alrededor del 60% del teórico estimado, en las siguientes se mantuvo alrededor del 80%.

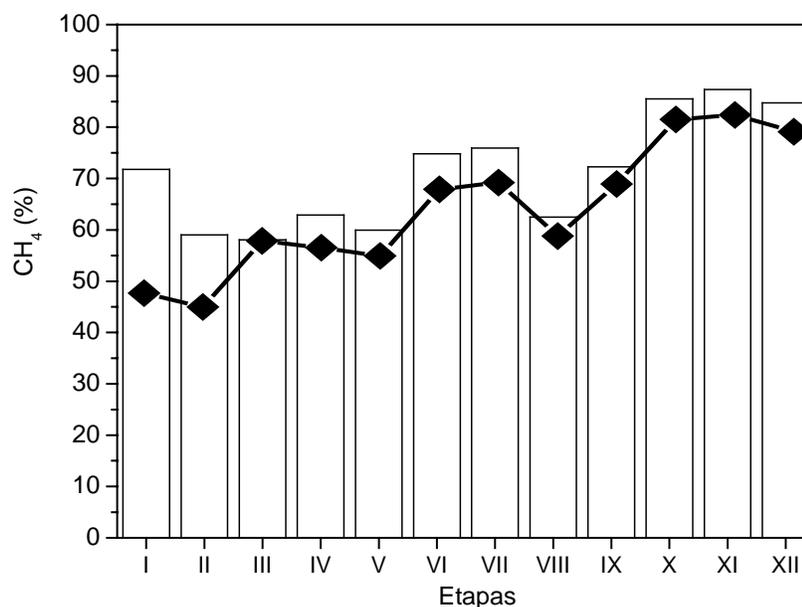


Figura 4.5. Evolución del metano durante las diferentes etapas de aclimatación a los compuestos. (◆) Transformación de compuestos a metano y (□) porcentaje de metano medido con respecto al estequiométrico.

2.2. Incremento de la carga orgánica volumétrica

Cuando la adición de los catorce compuestos se completó, el reactor todavía operó durante 21 días al mismo TRH. Posteriormente el TRH fue disminuido hasta 8 horas incrementando la B_v a $2.3 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (Figura 4.6), presentándose en la eficiencia de remoción un ligero decremento a un 89% y un incremento en la producción de metano que en promedio fue de $1.57 \text{ gDQO-CH}_4 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (Figura 4.7).

A un TRH de 6 horas y una B_v de $3.2 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, la eficiencia bajó hasta un 67% seguida de una recuperación que tomó alrededor de 10 días para alcanzar la máxima remoción (95%). El metano obtenido en estas condiciones fue de $1.25 \text{ gDQO-CH}_4 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$.

Con un TRH de 5 horas y $3.6 \text{ gDQO}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ la eficiencia disminuyó hasta un 75%, después de este tiempo la remoción promedio fue de 84%, mientras que la producción de metano incrementó ligeramente.

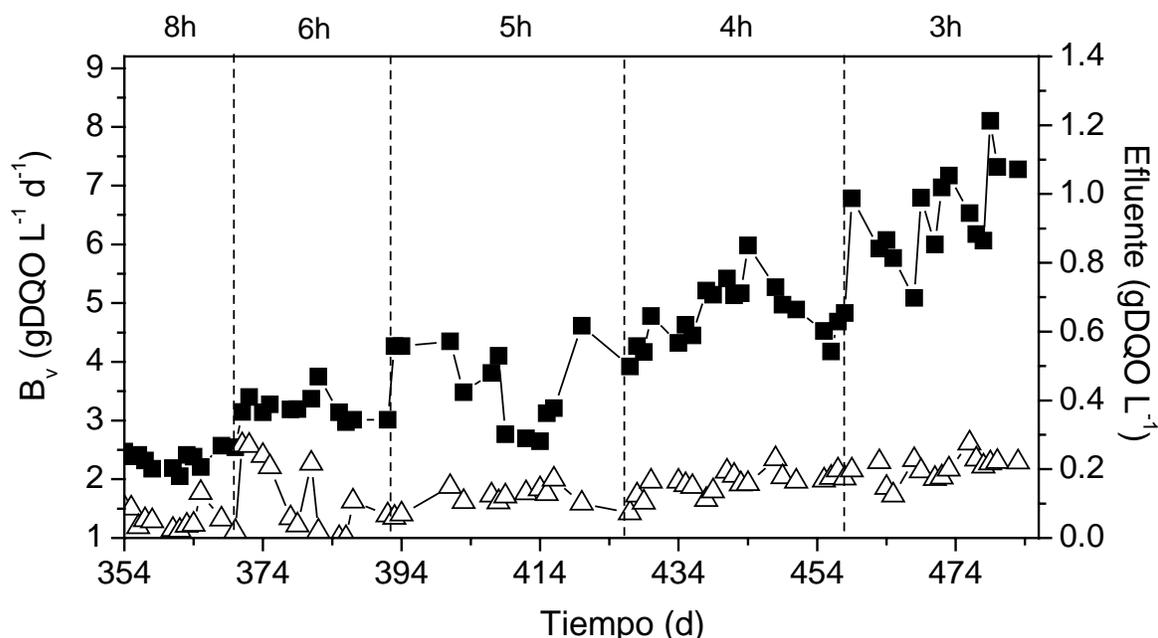


Figura 4.6. Comportamiento del reactor durante el aumento de la carga orgánica volumétrica por la disminución del TRH y DQO residual. (■) B_v en el influente; (△) concentración de materia orgánica en el efluente.

La disminución del TRH a 4 y 3 horas (4.8 y $6.5 \text{ gDQO}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), llevó a eficiencias de remoción promedio del 79 y 74% respectivamente. La producción de metano incrementó de 2.2 hasta $3 \text{ gDQO}\cdot\text{CH}_4\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. La disminución de la eficiencia de remoción en estas dos últimas etapas se debió probablemente a una sobrecarga en la capacidad metabólica del lodo, causada por los TRH tan cortos a los que se operó.

En la Figura 4.7 se muestra como el incremento de la carga orgánica volumétrica a valores mayores de $2.3 \text{ gDQO}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, tuvo un efecto más pronunciado sobre la eficiencia de remoción la cual no recuperó su valor inicial. Aunque se observa un incremento en la producción de metano conforme la B_v aumenta, éste no es equivalente a la B_v consumida como veremos más adelante.

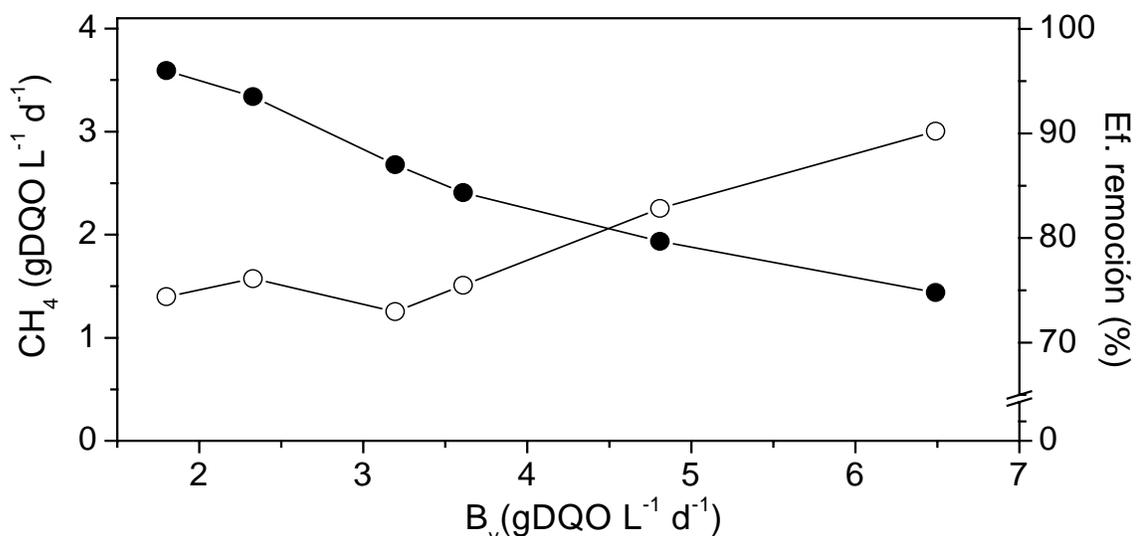


Figura 4.7. Disminución de la eficiencia de remoción promedio durante el aumento de la carga orgánica volumétrica y producción de metano. (●) Remoción; (○) metano.

La Figura 4.8 muestra que a TRH de 4 y 3 horas, sustratos como el ME, MA e intermediarios como el acetato y propionato se encontraron en el efluente en mayor concentración. También, se detectaron en concentraciones más bajas AA, BA, OX, PX, MX y ST.

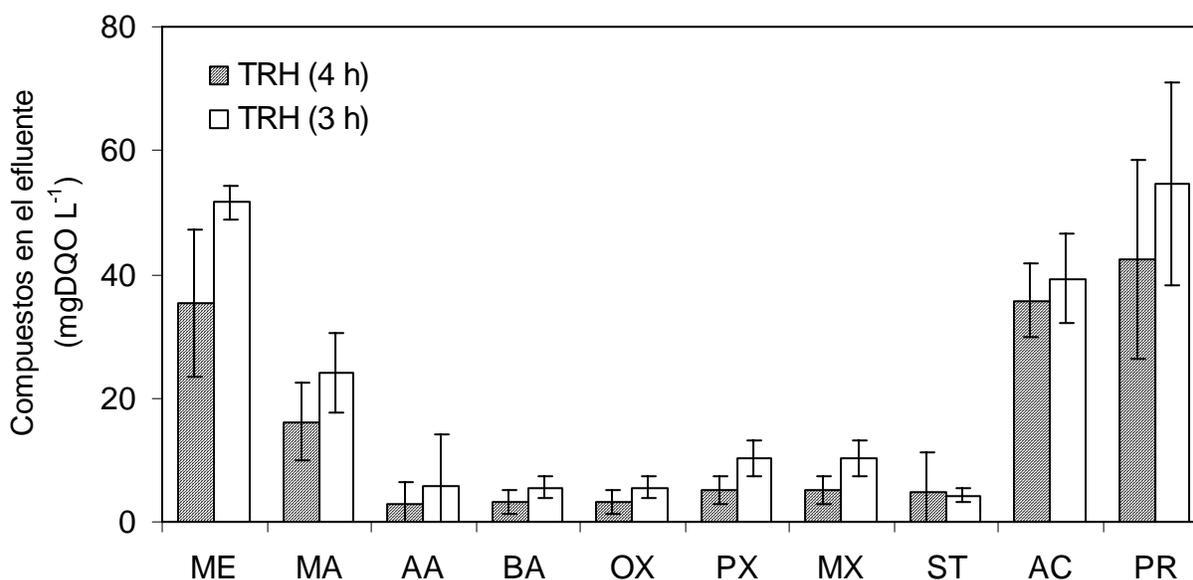


Figura 4.8. Compuestos químicos detectados en el efluente del reactor a 4 y 3 horas de TRH. (ME) metil acetato; (MA) metil acrilato; (AA) ácido acrílico; (BA) butil acrilato; (OX) *o*-xileno; (PX) *p*-xileno; (MX) *m*-xileno; (ST) estireno; (AC) acetato y (PR) propionato.

En ambos TRH todos estos compuestos representaron del 16 al 21% de la concentración alimentada. Además, se detectaron alrededor de 32% de los acrilatos y ácido acrílico alimentados. Bajo estas condiciones (TRH cortos) sólo los alcoholes se degradaron completamente.

Como se presenta en la Figura 4.9, durante la disminución de los TRH el reactor, el porcentaje más alto de transformación de los sustratos a metano se encontró a un TRH de 8 horas, a partir de este tiempo permaneció alrededor del 50%. Comportándose de manera similar el porcentaje de metano recuperado con respecto al teórico estimado, indicando que a un TRH por abajo de 8 horas los microorganismos muestran una capacidad de utilización de los compuestos menor y probablemente la pérdida por volatilidad incrementa.

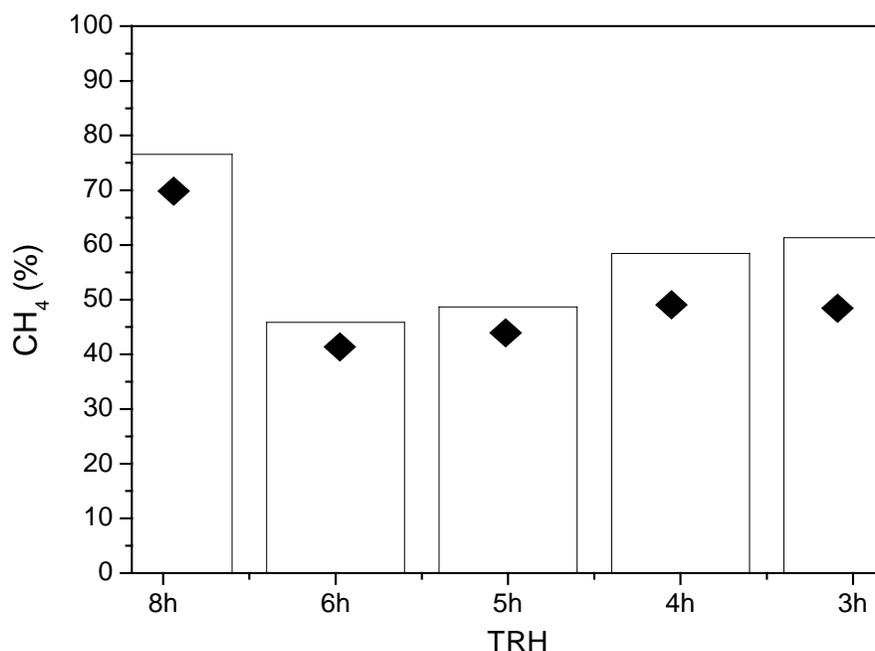


Figura 4.9. Evolución del metano cuando el reactor se operó a distintos TRH. (◆) Transformación de compuestos a metano y (□) porcentaje de metano medido con respecto al estequiométrico.

3. Conclusiones

Durante la etapa de adaptación del lodo a los compuestos en el reactor se encontró que el isopropanol y el ácido acrílico requirieron tiempos de adaptación alrededor de 40 días para ser eficientemente degradados. Compuestos como el metil acrilato y etilenglicol llevaron al reactor a periodos cortos de inestabilidad. Mientras que la adición de los compuestos

restantes no causaron un efecto negativo sobre la eficiencia de remoción. En la última etapa cuando todos los compuestos estaban presentes en el reactor, la eficiencia de remoción alcanzada fue del 95%. La metanización promedio de los compuestos aumentó desde 50% (obtenido en las dos primeras etapas) hasta alrededor de 80%.

Al aumentar la carga orgánica volumétrica a 2.3, 3.2, 3.6, 4.8 y 6.5 gDQO·L⁻¹·d⁻¹ las eficiencias de remoción disminuyeron en promedio hasta un 93, 87, 84, 79 y 74%, respectivamente. El metano producido de la degradación de los compuestos sólo fue alto durante la primera carga orgánica aplicada; en las posteriores el metano recuperado fue alrededor del 50% indicando la falta de cuantificación de algunos compuestos en el efluente, probablemente debido a su volatilización.

La actividad del lodo cambió utilizando preferentemente a los alcoholes, que a intermediarios como acetato y propionato, durante los niveles más altos de carga orgánica volumétrica, indicando que las bacterias acetogénicas y acetoclásticas fueron afectadas negativamente por estas condiciones y algunos compuestos que no se degradaron completamente se encontraron en el efluente (metil acetato, metil y butil acrilato, ácido acrílico, *o-m-p*-xileno y estireno).

Con los resultados anteriores se concluye que de las condiciones de operación del reactor UASB, las óptimas para el tratamiento de este tipo de aguas, en las que se obtienen altas eficiencias de remoción y recuperación de metano son a un TRH de 8h y una carga orgánica volumétrica de 2.3 gDQO·L⁻¹·d⁻¹.

V. BIODEGRADACIÓN DE ÁCIDO ACRÍLICO: EFECTO DE LA ADICIÓN DE ALCOHOLES

1. Antecedentes

El ácido acrílico es un producto intermediario en la fabricación de resinas, adhesivos, fibras sintéticas, dispersantes, floculantes (Budavari, 1989). Uno de los principales usos es en la fabricación de sus ésteres tales como metil, etil y butil acrilato (WA, 1997). En 1994 la producción mundial fue estimada en 2 millones de toneladas (Environmental Health Criteria 191, 1997). Este compuesto también se encuentra en aguas residuales industriales y es descargado junto con otras sustancias químicas como alcoholes. En Estados Unidos un inventario sobre descargas hecho en 1992 por distintos tipos de empresas industriales mostró que 9.9×10^3 ton fueron liberados al subsuelo, 1.2 ton se liberaron a la atmósfera, 41.8 ton a aguas superficiales y 0.9 ton a suelos (EPA, 1994a).

Como se mostró en los antecedentes y resultados de los Capítulos anteriores, el ácido acrílico al ser tratado por procesos biológicos como la digestión anaerobia causa toxicidad sobre algunas de las etapas que la constituyen, lo que se refleja en los niveles de transformación a metano.

La degradación de compuestos químicos significativamente tóxicos o recalcitrantes puede ser favorecida por la adición de sustratos primarios, en un proceso conocido como cometabolismo, en el cual un microorganismo oxida una sustancia sin ser capaz de utilizar la energía derivada de esta oxidación para soportar el crecimiento, y lo realiza en presencia de un segundo compuesto orgánico que es usado como fuente primaria de energía (Horvath, 1972; Madigan *et al.*, 2004).

La utilización de sustratos primarios en la degradación de ácido acrílico está poco documentada, en algunos estudios se han utilizado altas concentraciones de acetato ($2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), no obstante se requieren largos periodos de aclimatación (300 días) para degradar una carga orgánica volumétrica de $220 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ de este ácido (Demirer y Speece, 1999). Por otra parte, se ha encontrado que una mezcla de metil, etil y butil acrilato en una concentración menor a $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ puede ser degradada usando $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de acetato (Dohányos *et al.*, 1988). En los Capítulos III y IV de este estudio se observó que la presencia de acetato no favoreció la degradación del ácido acrílico.

En la literatura se han reportado otros sustratos primarios que mejoran la degradación de compuestos recalcitrantes. Speece (1996), menciona que uno de los cometabolitos más

efectivos para alcanzar la biotransformación secundaria de compuestos organoclorados ha sido el metanol, aunque también se usan frecuentemente, el etanol, el lactato y la glucosa. Tschuch y Pfennig (1984), reportan que este alcohol puede ser utilizado como donador de electrones para reducir la parte acrílica de compuestos como el cafeato. En otros estudios el etanol se ha utilizado para mejorar la degradación anaerobia de 2,4,6-trinitrotolueno y del colorante azo azul 79 (Davel *et al.*, 2003; Melgoza *et al.*, 2004).

Por otra parte, el ácido butírico y la glucosa se han utilizado como sustratos primarios que inducen la degradación de ácido tereftálico y *p*-toluico (Speece, 1996). Mientras que, el *n*-butirato promueve la deshalogenación del 2-clorofenol y del 2,6-diclorofenol (Dietrich y Winter, 1990). Speece (1996), menciona que si los sustratos primarios (como donadores de electrones o cometabolitos) no forman parte de un agua residual, estos pueden ser suministrados.

En base a lo anterior, se infiere que alcoholes como el metanol, etanol, etilenglicol, isopropanol y butanol podrían ser empleados como sustratos primarios, ya que a partir de sus reacciones de oxidación o reducción (ver Tabla 5.1) se liberan electrones y protones que pudieran ser utilizados en la saturación del doble enlace carbono-carbono del ácido acrílico, favoreciendo su velocidad de transformación y por ende eliminando la toxicidad sobre los distintos grupos bacterianos que integran el proceso de digestión anaerobia. Por otra parte, no se ha reportado la manera en que el ácido acrílico puede afectar la degradación de estos alcoholes.

En este Capítulo se estudió la influencia del metanol, etanol, etilenglicol, isopropanol y butanol en la degradación de ácido acrílico y a su vez, el efecto del ácido acrílico en la degradación de estos mismos alcoholes. Se muestra que la presencia de los alcoholes y/o algunos productos de su degradación favorecieron la velocidad específica de consumo del ácido acrílico, sin embargo, esto no llevó a la eliminación de la toxicidad sobre las bacterias metanogénicas acetoclásticas, aunque la disminuyó ligeramente. En las bacterias consumidoras de propionato la presencia de los alcoholes acentuó la toxicidad de este ácido. Por otra parte, se encontró que el ácido acrílico no tiene un efecto tóxico sobre las bacterias aclimatadas al consumo de metanol y butanol, pero sí sobre las consumidoras de etanol.

Además, este ácido afectó ligeramente el consumo de butirato, pero el efecto tóxico se eliminó rápidamente.

Tabla 5.1. Reacciones involucradas en la degradación de diversos alcoholes.

		$\Delta G^{\circ'}$
Metanol ^a	$4\text{CH}_3\text{OH} + 2\text{CO}_2 \rightarrow 3\text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O} + 3\text{H}^+$	-71(kJ/mol acetato)
Metanol ^b	$\text{CH}_3\text{OH} + \text{CO} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+$	-
Isopropanol ^c	$4\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow 4\text{CH}_3\text{COCH}_3 + \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	-36.5 kJ
Etilenglicol ^d	$\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OH} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + \text{H}_2$	-78 kJ/mol
Etanol ^d	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	+9.6 kJ/mol
Butanol ^e	$2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} + 2\text{HCO}_3^- \rightarrow 2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$	-
Butanol ^e	$2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} + \text{HCO}_3^- \rightarrow 2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + \text{CH}_4 + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$	-

^aDiekert y Wohlfarth (1994). ^bSchink (1994). ^cWiddel (1986). ^dThauer *et al.*, (1977). ^eEichler y Schink (1984). ^a $\Delta G^{\circ'}$ = condiciones estándar considerando el ion H^+ a pH 7.

2. Resultados y discusión

2.1. Biodegradación en lote de ácido acrílico en presencia de alcoholes

En la Figura 5.1a se observa que el ácido acrílico en presencia de metanol o isopropanol, presentó una fase lag similar, antes de iniciar el consumo, que finalizó en el mismo tiempo. Con etilenglicol, el ácido acrílico presentó una fase lag similar a los anteriores, pero requirió un periodo de tiempo mayor para ser consumido completamente. Mientras que con etanol, el ácido acrílico presentó la menor fase lag, seguido de una rápida utilización.

La Figura 5.1b muestra que el metanol no promovió el consumo del ácido acrílico ya que su degradación inició después de que el ácido se había transformado completamente. El isopropanol se consumió gradualmente durante todo el ensayo, sin embargo al final una fracción permaneció sin ser utilizada. El etanol se consumió rápidamente y se terminó poco antes de que el ácido acrílico se consumiera totalmente.

Igualmente, en la Tabla 5.2 se muestra que el ácido acrílico alcanzó una velocidad específica de consumo más alta cuando se utilizó etanol, seguido del isopropanol, metanol y

la menor con etilenglicol. De la misma manera, la velocidad específica de consumo de los alcoholes fue mayor para el etanol, seguida del metanol y del isopropanol.

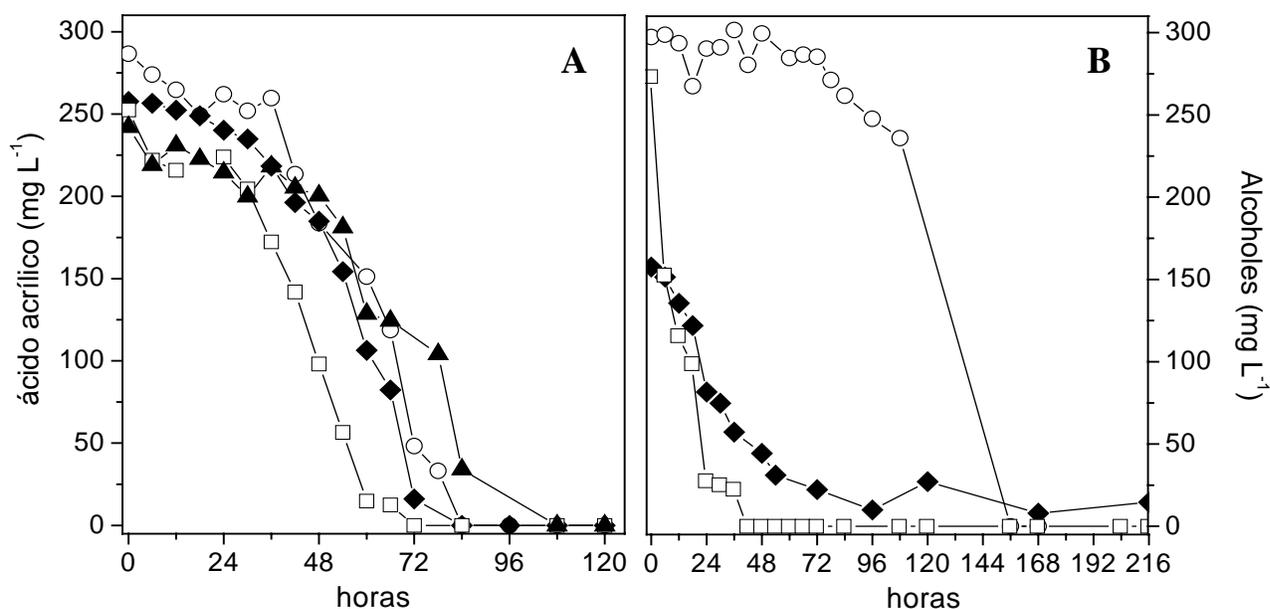


Figura 5.1. Degradación de ácido acrílico en presencia de los alcoholes (A) y consumo de los alcoholes (B); (○) metanol; (◆) isopropanol; (□) etanol; (▲) etilenglicol.

Tabla 5.2. Velocidades específicas de consumo de sustratos y producción de metano.

	$V_{EC/H \text{ AA}}$ ($g \cdot gSSV^{-1} \cdot d^{-1}$)	$V_{EC/H \text{ OH}}$ ($g \cdot gSSV^{-1} \cdot d^{-1}$)	$V_{Esp \text{ CH}_4}$ ($gDQO-CH_4 \cdot gSSV^{-1} \cdot d^{-1}$)
Metanol	0.028	0.026	0.02
Isopropanol	0.032	0.013	0.009
Etilenglicol	0.021	n.d.	0.023
Etanol	0.034	0.048	0.038

$V_{EC/H \text{ AA}}$: velocidad específica de consumo de ácido acrílico; $V_{EC/H \text{ OH}}$: velocidad específica de consumo de alcohol; $V_{Esp \text{ CH}_4}$: velocidad específica de producción de metano.

No obstante a que tanto el ácido acrílico como los alcoholes se consumieron, los intermediarios producidos como acetato, propionato y acetona no se degradaron completamente (ver Figura 5.2).

La Figura 5.3 muestra la producción de metano. En la prueba en la que se utilizó metanol se formaron 250 mgDQO-CH₄·L⁻¹ que representan una recuperación del 30%; mientras que con isopropanol fue del 3%. En cambio con etanol se alcanzó una recuperación del 37%, de los cuales el 60% aparentemente provino del hidrógeno formado durante la fermentación del etanol y un 23% a partir del acetato consumido al inicio. En el ensayo con etilenglicol se produjeron 267.5 mgDQO-CH₄·L⁻¹, de los cuales el hidrógeno probablemente contribuyó con 36% y el acetato con 20%. De ambas pruebas se infiere que un porcentaje del metano fue producido por bacterias metanogénicas hidrogenotrofas, ya que cuando el etanol o etilenglicol se terminaron, la metanogénesis también se detuvo.

La mayor velocidad específica de producción de metano se alcanzó con el etanol, seguida del etilenglicol y metanol, con isopropanol fue despreciable (Tabla 5.2). Los bajos niveles de mineralización están asociados a la acumulación de acetato, propionato y acetona provenientes del ácido acrílico y de los respectivos alcoholes.

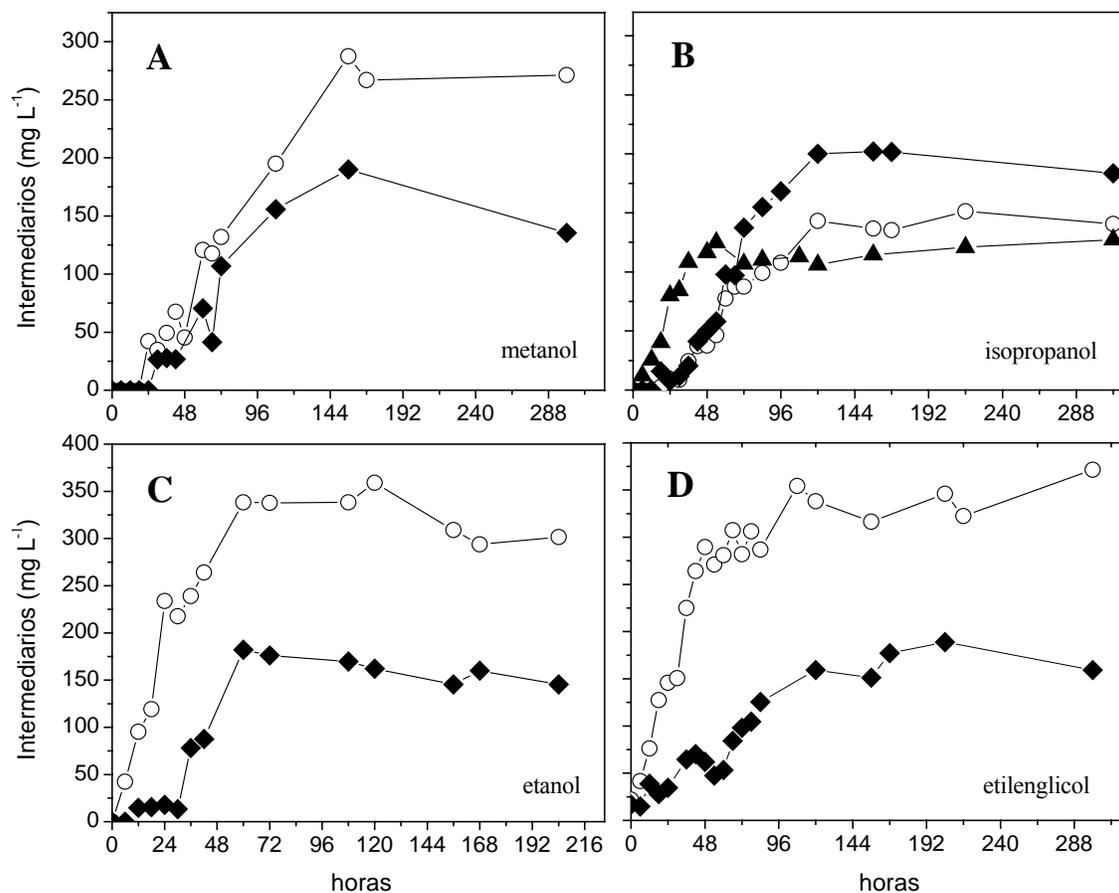


Figura 5.2. Intermediarios formados a partir de la degradación del ácido acrílico y de los alcoholes (○) acetato; (◆) propionato; (▲) acetona.

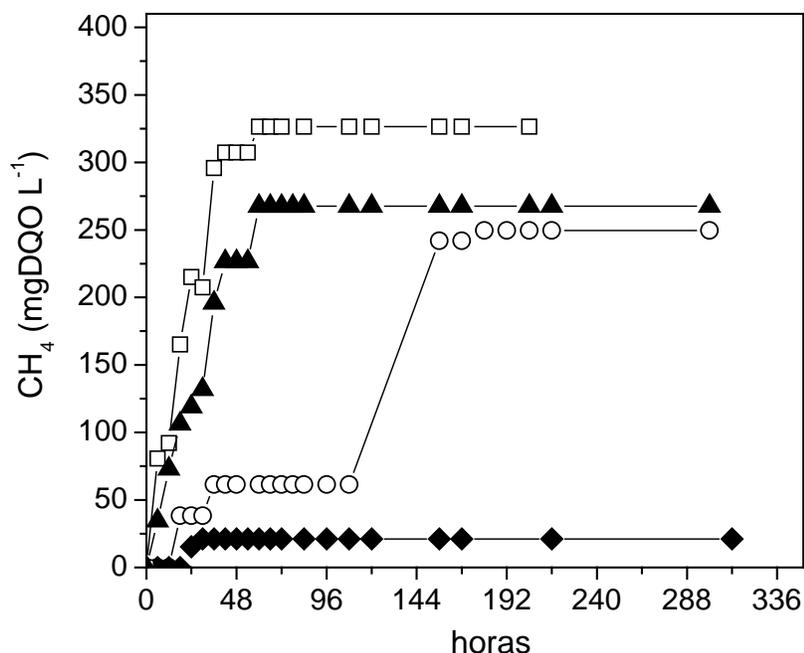


Figura 5.3. Producción de metano a partir de la degradación de ácido acrílico y de los alcoholes (○) metanol; (◆) isopropanol; (□) etanol; (▲) etilenglicol.

Aunque se ha encontrado que el metanol favorece la degradación de compuestos organoclorados (Speece, 1996) o compuestos como los alquencilbencenos, en los cuales la parte acrílica se reduce con este donador de electrones (Tschech y Pfennig, 1984); en estas pruebas no contribuyó en la degradación del ácido acrílico, aparentemente por la falta de adaptación del inóculo a este alcohol, que lo llevó a presentar una fase lag prolongada antes de consumirse, periodo en el que el ácido acrílico ya había sido agotado. Probablemente el metanol podría contribuir en la degradación si el inóculo es aclimatado previamente.

El isopropanol presentó una baja velocidad específica de consumo pero la del ácido acrílico fue alta; aparentemente la oxidación de este alcohol la favoreció. Sin embargo, los intermediarios formados son recalcitrantes, aunado a que una posterior transformación de estos no generaría donadores de electrones que pudieran ser empleados en la saturación del acrilato, por lo que se descartó su utilización en las pruebas en continuo.

La alta velocidad específica de consumo del etanol mejoró la velocidad de consumo del ácido acrílico, ya que probablemente produjo el hidrógeno necesario para la saturación del doble enlace, como se mostró en el mecanismo sugerido por Gottschalk (1986). Además este

alcohol es un sustrato que estimula la degradación anaerobia de ciertos compuestos (Speece, 1996).

La velocidad de consumo del ácido acrílico con etilenglicol debería haber sido similar a la encontrada con etanol, ya que entre las reacciones intermedias que involucran la degradación del etilenglicol está la producción de etanol, acetato e hidrógeno (Dwyer y Tiedje, 1983), pero el paso por estas reacciones consecutivas provoca un retraso en la disponibilidad de los intermediarios útiles, por lo que tampoco se empleó en las pruebas en continuo.

2.2. Degradación de ácido acrílico con alcoholes en reactores continuos

Los alcoholes probados en la degradación en continuo del ácido acrílico fueron metanol, etanol y butanol. La utilización de este último alcohol se planteó a partir de que durante su oxidación a butirato, se producen donadores de electrones que pudieran ser empleados en la reducción del ácido acrílico y adicionalmente determinar si el acrílico causaba toxicidad a las bacterias consumidoras de butirato. Los experimentos se dividieron en dos etapas, la primera de aclimatación a acetato, propionato y al respectivo alcohol y la segunda correspondiente a la adición del ácido acrílico.

2.2.1. Reactor control (RC)

La evolución del reactor (RC) al cual no se le adicionó ninguno de los alcoholes se muestra en la Figura 5.4. Durante la aclimatación, la utilización completa del acetato y propionato requirieron de 46 y 32 días respectivamente (Figura 5.4a y b); después de este tiempo y hasta antes de la adición del ácido acrílico la remoción de ambos sustratos permaneció en un promedio del 90 y 98%, respectivamente. El metano promedio producido en este periodo de estabilización fue de $0.14 \text{ L}\cdot\text{d}^{-1}$ (Figura 5.4d), y como consecuencia de la eficiente degradación de los ácidos grasos la relación de alcalinidades se mantuvo en 0.8.

El día 56 el acetato y el propionato se retiraron y como se muestra en la Figura 5.4c, el ácido acrílico se alimentó al reactor consumiéndose completamente en los 3 días posteriores. No obstante a la aclimatación del consorcio bacteriano a ambos sustratos, la adición del acrilato afectó severamente la utilización del acetato y en menor grado la del propionato

producidos a partir del acrilato, disminuyendo hasta 17 y 58% respectivamente. Después de 15 días se consumieron nuevamente alcanzando valores similares a los de la etapa de aclimatación.

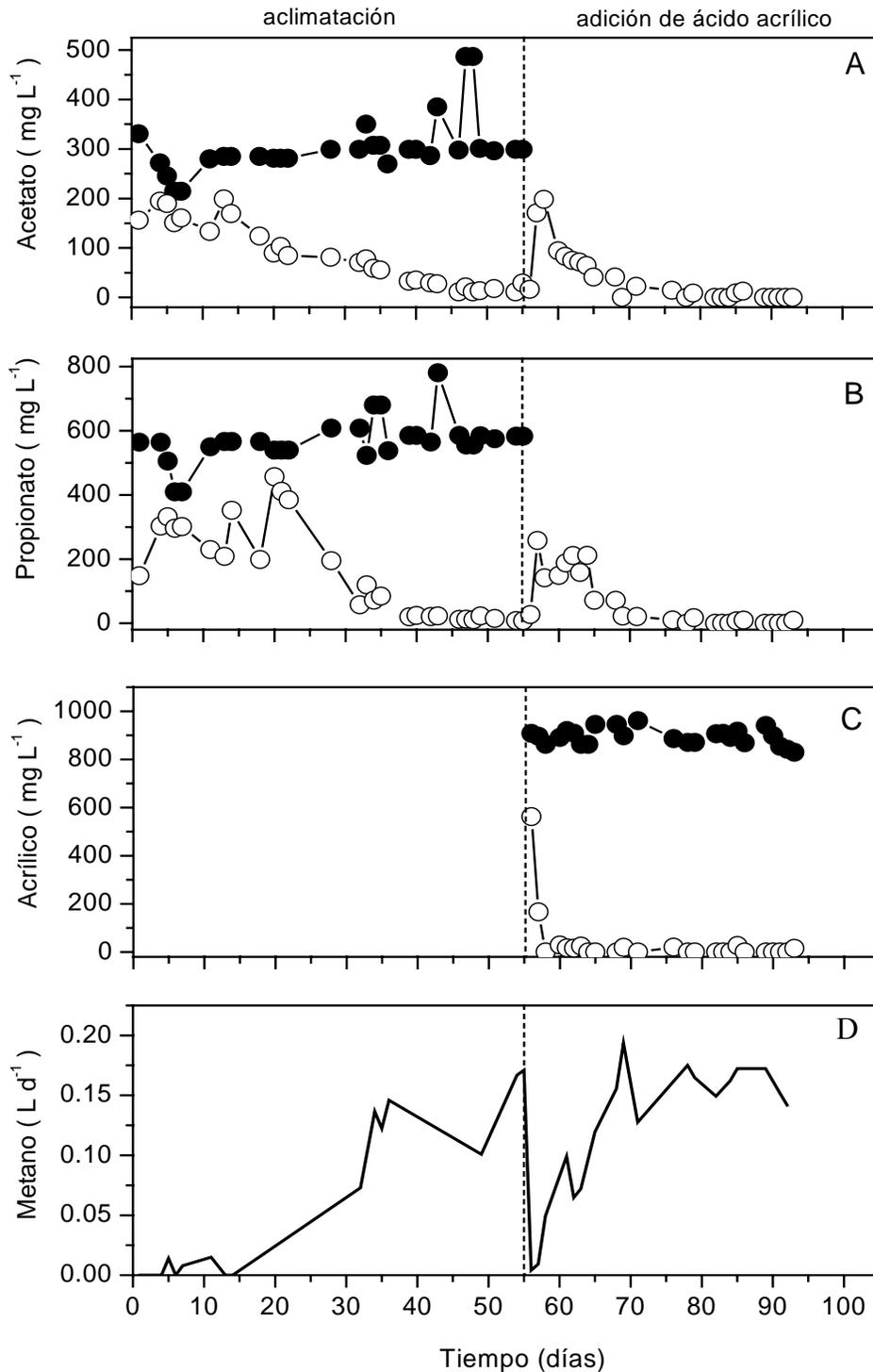


Figura 5.4. Reactor RC: degradación de ácido acrílico, sin la adición de alcohol (●) influente y (○) efluente.

La producción de metano fue anulada y se recuperó paulatinamente hasta alcanzar $0.19 \text{ L}\cdot\text{d}^{-1}$. Debido a la acumulación de intermediarios, la relación de alcalinidades disminuyó hasta 0.4 y para controlar la acidificación se adicionaron $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de bicarbonato de sodio, 4 días más tarde esta se recuperó manteniéndose alrededor de 0.71.

2.2.2. Reactor con metanol (RM)

Durante el arranque del reactor RM, al igual que en las pruebas en lote, el metanol se degradó completamente en los primeros 5 días (Figura 5.5a). Mientras que el acetato y propionato requirieron 30 y 36 días para ser mineralizados (Figura 5.5b y c), con eficiencias de remoción de 82 y 91% y una producción de metano promedio de $0.17 \text{ L}\cdot\text{d}^{-1}$ (5.5e).

A partir del día 50 se alimentó el ácido acrílico y su transformación completa tomó 5 días (Figura 5.5d). La adición de este ácido no afectó negativamente la degradación de metanol, pero la remoción de acetato disminuyó a 25% y se recuperó paulatinamente dentro de los 37 días posteriores a la adición. La remoción del propionato también decreció hasta 25% y permaneció sin recuperarse durante 37 días, seguida de un rápido consumo. Debido a que el metanol fue continuamente degradado, la producción de metano sólo decayó a $0.07 \text{ L}\cdot\text{d}^{-1}$, seguida de una recuperación alcanzando alrededor de $0.15 \text{ L}\cdot\text{d}^{-1}$ (Figura 5.5e).

2.2.3. Reactor con etanol (RE)

El comportamiento del reactor RE se muestra en la Figura 5.6. En la etapa de aclimatación el etanol se consumió en los 5 días posteriores al arranque (Figura 5.6a), sin embargo, al transformarse en acetato requirió 33 días para alcanzar una degradación constante, 90% en promedio (Figura 5.6b). El propionato tardó 40 días en ser consumido totalmente (Figura 5.6c) con eficiencias de remoción alrededor de 95%. La producción de metano incrementó y el promedio fue de $0.17 \text{ L}\cdot\text{d}^{-1}$ (Figura 5.6e), mientras que la relación de alcalinidades permaneció alrededor de 0.76. El día 56 se adicionó acrilato, requiriendo 3 días para su completa transformación (Figura 5.6d), la degradación de etanol disminuyó hasta un 55%, recuperándose 6 días mas tarde. En este tiempo algunos intermediarios temporales

como 1-propanol, etil acrilato y 2-propen-1-ol ($\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{OH}$) se detectaron en el efluente.

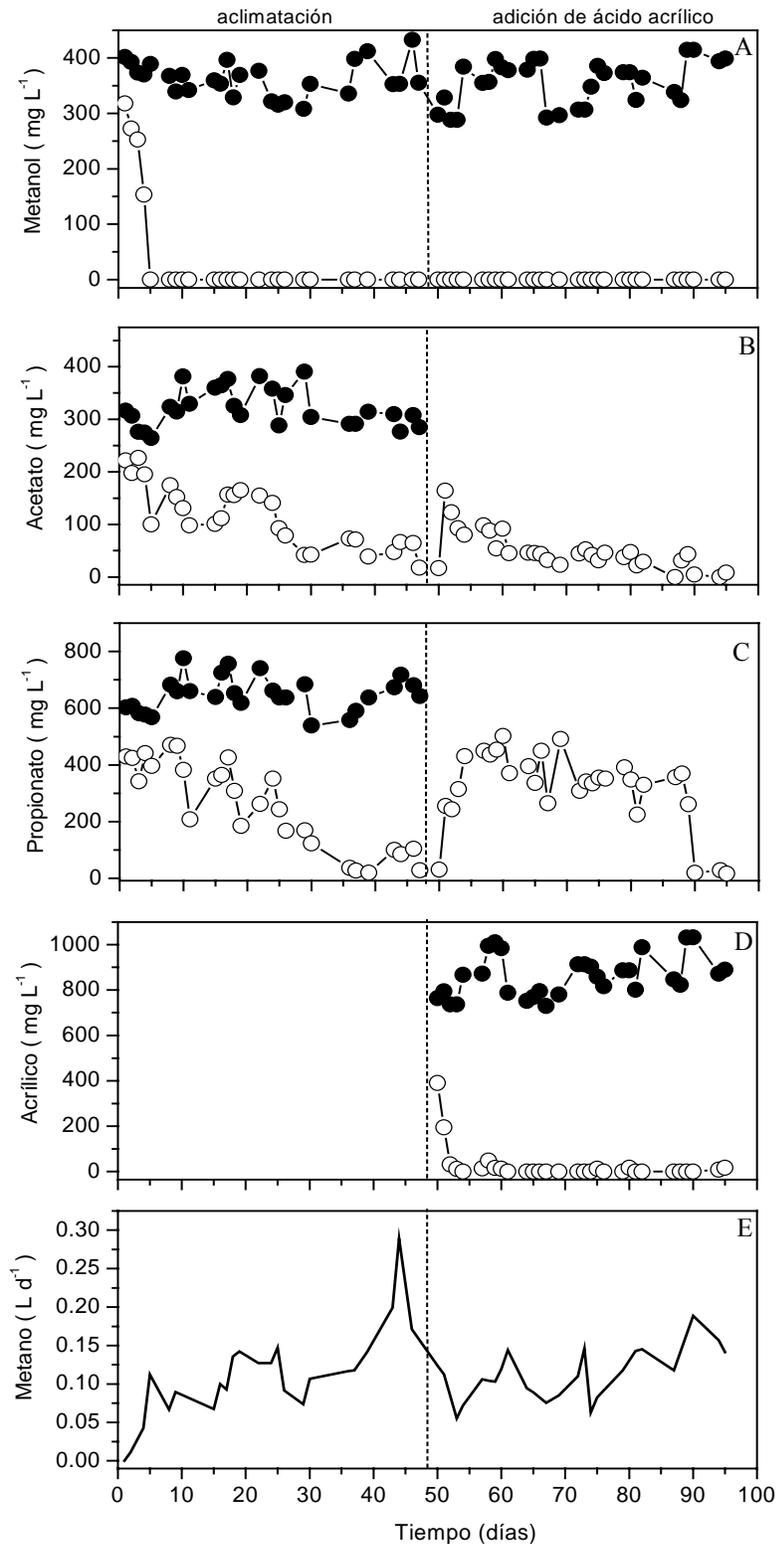


Figura 5.5. Reactor RM: degradación del ácido acrílico con metanol. (●) Influyente y (○) efluente.

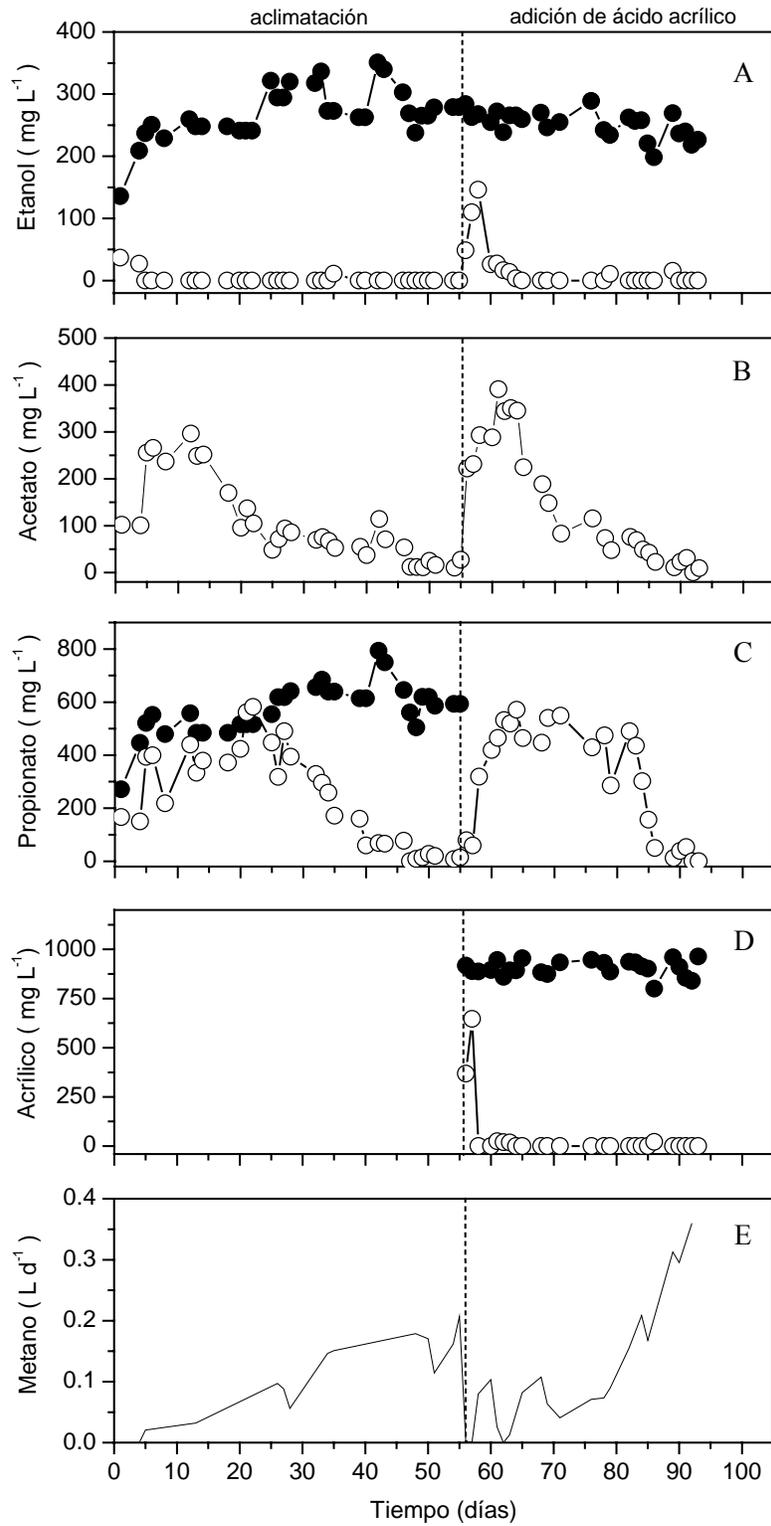


Figura 5.6. Reactor RE: degradación de ácido acrílico con etanol. (●) Influyente y (○) efluente.

La mineralización del acetato decreció hasta un 36% e inició su recuperación hasta que el ácido acrílico y el etanol fueron totalmente utilizados. La mineralización del propionato resultó severamente afectada, disminuyendo la eficiencia de remoción a 7% y presentando un periodo prolongado de acumulación.

La producción de metano fue suspendida completamente y se recuperó una vez que el acetato y propionato se degradaron nuevamente, alcanzando una producción máxima de $0.35 \text{ L}\cdot\text{d}^{-1}$. La alcalinidad disminuyó a 0.4 y requirió de la adición de bicarbonato para neutralizar la acidificación, después de 4 días fue de 0.7.

2.2.4. Reactor alimentado con butanol (RB)

En la Figura 5.7 se presenta el comportamiento del reactor RB. En la primera etapa, el butanol se consumió en los 3 primeros días, siendo transformado a butirato, el cual fue paulatinamente consumido en los siguientes 33 días (Figura 5.7a). La degradación completa del acetato y propionato se alcanzó después de 50 días (Figuras 5.7b y c), con eficiencias de remoción del 89 y 94%. La producción de metano incrementó lentamente hasta alcanzar $0.42 \text{ L}\cdot\text{d}^{-1}$ (Figura 5.7e). La relación de alcalinidades se mantuvo alrededor de 0.73.

La adición de ácido acrílico se realizó el día 67 (Figura 5.7d) y este fue inmediatamente transformado a sus intermediarios, no obstante, causó la disminución del consumo de acetato y de propionato hasta un 38 y 26% y se recuperó en los 15 y 18 días posteriores, respectivamente. La transformación de butanol a butirato no se vio afectada y la utilización de este intermediario decreció en un 13%, seguida de una rápida recuperación. La producción de metano cayó a $0.1 \text{ L}\cdot\text{d}^{-1}$, siendo paulatinamente recuperada hasta alcanzar $0.36 \text{ L}\cdot\text{d}^{-1}$. La relación de alcalinidades disminuyó hasta 0.35 y la adición de bicarbonato la mantuvo alrededor de 0.89.

2.2.5. Comparación de la degradación del ácido acrílico y alcoholes en reactores continuos.

Comparando entre cada uno de los experimentos llevados a cabo (Tabla 5.3), se observa que durante la etapa de aclimatación en el reactor RB el acetato requirió un periodo más

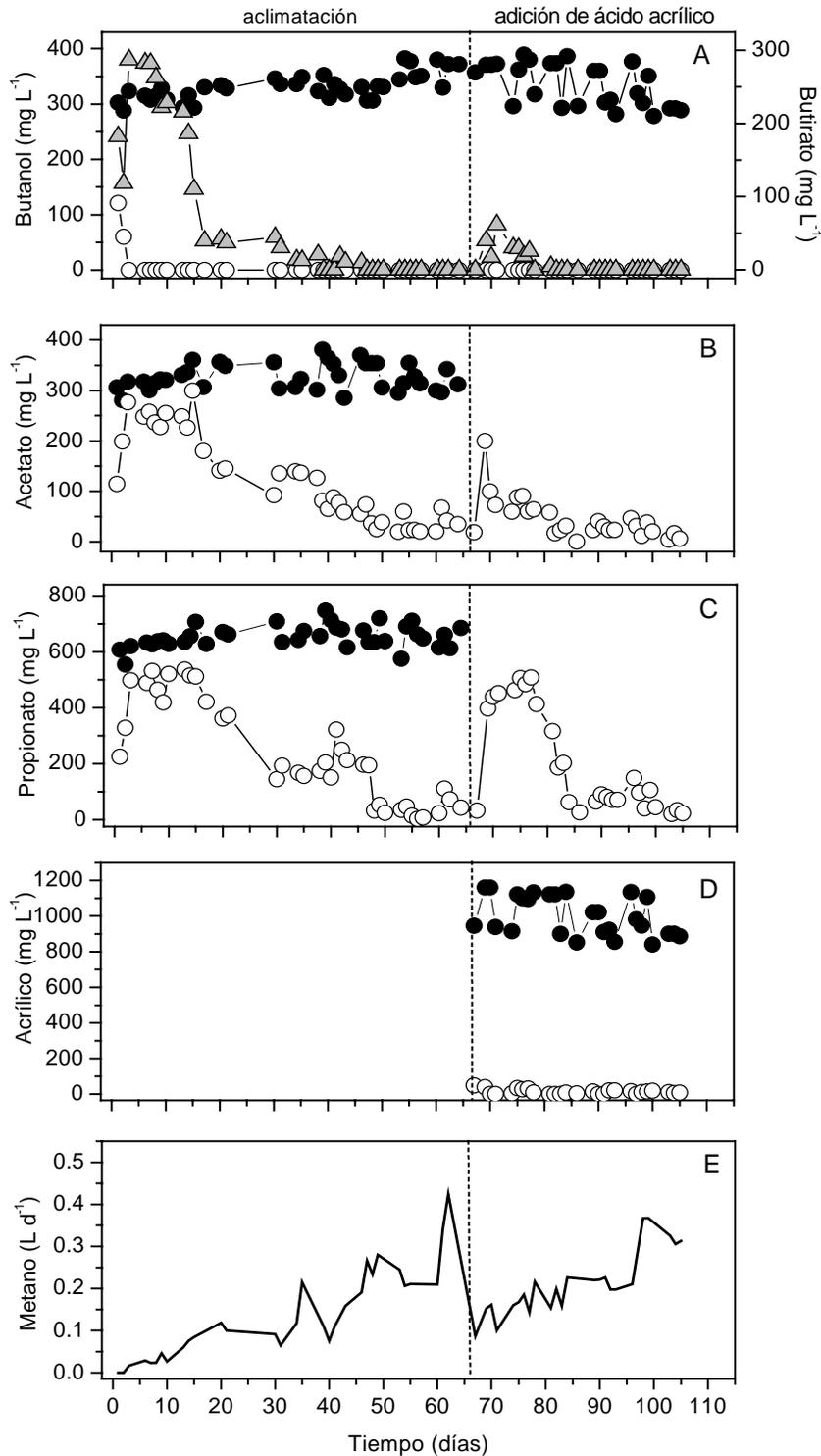


Figura 5.7. RB: degradación de ácido acrílico con butanol; consumo de intermediarios y evolución de la producción de metano. (●) influente; (○) efluente; (▲) butirato.

amplio para alcanzar una remoción cercana al 90%, probablemente debido a que la concentración de acetato en este reactor fue más alta por el proveniente de la degradación de butanol. El periodo de aclimatación a propionato fue similar en los reactores RC y RM, en los reactores RE y RB este fue mayor. En el caso del etanol puede ser debido a la competencia entre un sustrato fácilmente biodegradable como el etanol que es utilizado preferentemente sobre el propionato como han reportado Hyun *et al.* (2001). En el reactor RB el butanol podría haber afectado la utilización del propionato de manera análoga a la del etanol. La inhibición del butirato se descarta ya que en condiciones termofílicas han mostrado que este no inhibe la utilización del propionato (van Lier, 1993). La eficiencia de remoción de acetato alcanzada en esta etapa fue similar en todos los reactores (90%), excepto para el RM. Para el propionato la eficiencia de remoción más alta se alcanzó en el RC. En los demás reactores variaron entre 91 y 95%.

Como se muestra en la Tabla 5.3, el metanol requirió cinco días de aclimatación para ser completamente consumido, coincidiendo con el tiempo que requirió en las pruebas en lote. El consumo de etanol se llevó a cabo en el mismo periodo, mientras que para el butanol la aclimatación requirió un menor tiempo. Los tres alcoholes alcanzaron eficiencias de consumo del 100%.

En la etapa de adición del tóxico (Tabla 5.3), el ácido acrílico fue inmediatamente transformado en el reactor RB, presentando la más alta velocidad específica de consumo. En los reactores RC y RE requirió tres días obteniendo una velocidad específica de consumo mayor el segundo. En el RM fueron necesarios hasta cinco días para obtener la degradación completa del ácido acrílico y presentó la menor velocidad de consumo. Las altas velocidades de consumo para el RE y RB no favorecieron la hipótesis de eliminación de la toxicidad sobre los distintos grupos bacterianos que integran el proceso de digestión anaerobia; y aunque para algunos la toxicidad fue atenuada, en otros casos esta se acentuó como se muestra enseguida.

A pesar de la aclimatación de los consorcios a acetato, la adición del ácido acrílico en los cuatro reactores afectó su consumo, siendo más severo en el RC, sugiriendo que la aclimatación a los diferentes alcoholes atenuó ligeramente el efecto tóxico del ácido acrílico sobre las bacterias metanogénicas acetoclásticas.

Tabla 5.3. Comparación del comportamiento de los cuatro reactores degradando ácido acrílico y alcoholes.

Etapas		Sustratos	RC	RM	RE	RB
A	Tiempo de aclimatación (d)	Acetato	46	30	33	50
		Propionato	32	36	40	50
		Alcohol	-	5	5	3
		Butirato	-	-	-	33
	Ef. Remoción (%)	Acetato	90	82	90	89
		Propionato	98	91	95	94
		Alcohol	-	100	100	100
	Metano (L·d ⁻¹)	Recuperado	0.14	0.17	0.16	0.27
		Estequiométrico	0.16	0.31	0.23	0.41
B	Ácido acrílico	Adaptación (d)	3	5	3	0
		V _{EC/HAA} (g·gSSV ⁻¹ ·d ⁻¹)	0.045	0.037	0.079	0.11
	Ef. Remoción (%)	Acetato	17	25	36	38
		Propionato	58	25	7	26
		Alcohol	-	100	55	100
	Tiempo de Recuperación (d)	Acetato	15	37	30	15
		Propionato	15	37	30	18
		Alcohol	-	0	6	0
	*Metano (L·d ⁻¹)	Recuperado	0.16	0.16	0.28	0.26
		Estequiométrico	0.21	0.30	0.32	0.36

A) Aclimatación. B) Adición del ácido acrílico. *Promedio en los periodos de alta eficiencia de remoción. V_{EC/HAA}: velocidad específica de consumo del ácido acrílico.

La degradación del propionato, contrario al RC, decreció más en los tres reactores alimentados con alcoholes, presentándose un periodo más largo para su reutilización en el RM y el RE. Aparentemente en el RE el etanol actuó como un inhibidor sinérgico en la utilización del propionato, debido a una represión catabólica. En el caso del RM, la prolongada recuperación se debió al efecto tóxico del ácido acrílico sobre las bacterias utilizadoras de propionato. En el RB, la utilización de propionato se recuperó rápidamente y la degradación del butirato fue escasamente afectada.

En resumen, empleando consorcios previamente adaptados a acetato y propionato, una concentración de 918 mg·L⁻¹ de ácido acrílico como único sustrato fue completamente degradado después de 15 días, mientras que en presencia de los alcoholes el periodo de recuperación de consumo de acetato y propionato fue entre 15 y 37 días. Aunque los periodos de recuperación en este estudio parecen prolongados, se ha reportado que en un

cultivo enriquecido con *Methanosarcina* utilizando acetato ($2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) como sustrato primario, $900 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido acrílico causaron inhibición sobre las bacterias utilizadoras de acetato y propionato, requiriendo un periodo de 44 días para recuperar la actividad sobre estos sustratos en reactores de tanque agitado. Mientras que para un cultivo homogenizado y en el que predominaban bacterias acetogénicas y metanogénicas después de 50 días de inhibición el ácido acrílico fue consumido como único sustrato (Demirer y Speece, 1999).

El periodo de recuperación del consumo de acetato en cultivos en lote adaptados fue de 16 días después de la adición de $750 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido acrílico (Qu y Bhattacharya, 1996), similar al encontrado en este estudio, mientras que el periodo de recuperación del consumo de propionato después de la adición de ácido acrílico ($500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) es de 28 días (Qu y Bhattacharya, 1996)

Demirer y Speece (1999), reportan que con lodo previamente adaptado a ácido acrílico y alimentado como única fuente de carbono alcanzaron una transformación del 99%, sin embargo los intermediarios acetato y propionato no se degradaron, argumentando que las bacterias utilizadoras de propionato no estaban presentes en cantidades suficientes, dado que el inóculo provenía de un cultivo enriquecido con acetato. En este estudio se muestra que aún con lodo adaptado a propionato el ácido acrílico afecta negativamente su utilización tal como lo reportaron Qu y Bhattacharya (1996). Además la presencia de metanol, butanol y en mayor grado la del etanol incrementaron el efecto tóxico del ácido acrílico sobre las bacterias consumidoras de propionato.

La máxima carga orgánica volumétrica consumida cuando los alcoholes estuvieron presentes fue de $1.84 \text{ g ácido acrílico}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, mientras que en reactores agitados utilizando acetato como sustrato primario después de 300 días de aclimatación han alcanzado $220 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (Demirer y Speece, 1999). A pesar de que la presencia de alcoholes afectó la degradación de propionato, la carga orgánica degradada fue mayor y se alcanzó en menor tiempo.

La adición del ácido acrílico (Tabla 5.3) causó toxicidad aguda sobre las bacterias acetogénicas utilizadoras de etanol. En este tiempo algunos intermediarios como el 1-propanol, etil acrilato y 2-propen-1-ol se detectaron en el efluente. La formación del 1-propanol fue debida a la reducción del propionato por los protones producidos de la

oxidación del etanol como reportan Smith y McCarty (1989). El segundo pudo haberse formado de la síntesis de etanol con el ácido acrílico y el tercero provenir de la reducción del ácido acrílico. Para el último, la CI_{50} reportada es alta ($3000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y en procesos continuos aclimatados por 30 días, una concentración de $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ se remueve eficientemente (Demirer y Speece, 1998).

La eficiencia de remoción de butanol y metanol no fue afectada negativamente por la adición del acrilato, mostrando que en lodos aclimatados a estos alcoholes este ácido no tiene un efecto tóxico sobre las bacterias fermentativas que oxidan butanol y las consumidoras de metanol, que probablemente siguieron una vía de degradación independiente como lo es la metilotrofia. En el RB se encontró que la presencia del ácido acrílico afectó escasamente la degradación de butirato.

3. Conclusiones

De los alcoholes probados en sistemas en lote, con etanol se alcanzó la mayor velocidad específica de consumo de ácido acrílico ($0.034 \text{ g}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), así como la mayor velocidad específica de consumo del etanol ($0.048 \text{ g}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), sin embargo, una fracción de los intermediarios producidos no se degradaron. Por otra parte, la falta de aclimatación del lodo a metanol provocó que este fuera consumido cuando el ácido acrílico ya se había terminado. El isopropanol, por los intermediarios recalcitrantes que produce y el etilenglicol por las diferentes reacciones involucradas que retrasan la disponibilidad de los sustratos utilizables, se descartaron como sustratos que favorecerían la degradación del ácido acrílico.

Los resultados en continuo mostraron que aunque la presencia de alcoholes como butanol y el etanol favorecieron la velocidad de consumo del ácido acrílico (0.079 y $0.11 \text{ g}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, respectivamente), el efecto tóxico no se eliminó. Sin embargo la presencia de los alcoholes (metanol, etanol o butanol) disminuyó el efecto tóxico sobre las bacterias metanogénicas acetoclásticas. Caso contrario en las bacterias utilizadoras de propionato, en las que la presencia de alcoholes lo incrementó. No obstante los tiempos de recuperación de la utilización del acetato y del propionato fueron menores respecto a otros estudios en donde se ha empleado acetato como suplemento.

Por otro lado el ácido acrílico causó una inhibición de la acetogénesis de etanol, sin afectar las vías de degradación del metanol (metilotrofia), butanol (oxidación) y sólo en un menor grado la de butirato (β -oxidación).

VI. CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES

1. Conclusiones generales

El objetivo de este trabajo fue evaluar la biodegradación anaerobia de compuestos petroquímicos con diferente estructura química, entre los que se encuentran alcoholes, ésteres acéticos, ésteres acrílicos y aromáticos. Se partió de la hipótesis de que la integración de diferentes grupos bacterianos con metabolismos variados como el fermentativo, acidogénico y metanogénico que conforman el proceso de digestión anaerobia, permitirían la degradación de estos compuestos, que estarían presentes de manera simultánea en aguas de desecho.

Se encontró que la hipótesis no se cumplió para todos los casos, ya que cuando se evaluó la biodegradabilidad de compuestos en sistemas en lote con lodos no adaptados, se encontró que algunos de estos como el isopropil acetato, metil acrilato y butil acrilato adicionados como únicos sustratos no se degradaron completamente, en el primer caso debido a que se formaron intermediarios como el isopropanol y la acetona que resultaron recalcitrantes en estas condiciones. En el segundo y tercer caso debido a una inhibición causada por el ácido acrílico formado sobre las bacterias consumidoras de acetato y propionato.

Cuando los compuestos se alimentaron en mezclas por similitud de estructuras químicas en las mismas condiciones que los anteriores se encontró que:

En la mezcla de ésteres del ácido acético, todos los compuestos fueron degradados excepto los intermediarios como el isopropanol y la acetona formada durante su reducción. En la mezcla de alcoholes coincidentemente estos mismos compuestos evitaron la completa degradación. Mientras que en la mezcla de ésteres del ácido acrílico se encontró que una limitante para alcanzar la completa biodegradabilidad fue la acumulación temporal de acetato y la permanente del propionato y butirato, causada por la inhibición del ácido acrílico sobre los grupos bacterianos que los consumen.

Los índices de toxicidad para las mezclas de alcoholes y de ésteres del ácido acético fueron altos, indicando que las bacterias pueden tolerar concentraciones elevadas de estos compuestos y sólo requieren de un tiempo de aclimatación para transformarlos completamente a metano. Caso contrario en la mezcla de ésteres del ácido acrílico en la que concentraciones 70 veces menores a las encontradas en las otras dos mezclas causaron toxicidad.

Sin embargo en el sistema continuo la hipótesis fue aceptada incluso para una mezcla más compleja como la formada por todos los compuestos (metanol, isopropanol, anhídrido acético, butil y metil acrilato, metil acetato, ácido acrílico, etil acetato, isopropil acetato, etilenglicol, *para-meta* y *orto-xileno* y estireno), en donde se observó que aquellos que en sistemas en lote limitaron la biodegradabilidad como el isopropanol y el ácido acrílico, después de un periodo de aclimatación fueron degradados eficientemente. Compuestos como el metil acrilato y el etilenglicol provocaron una ligera inestabilidad en el desempeño del reactor, mientras que los compuestos restantes se degradaron eficientemente. Cuando la mezcla completa se alimentó al reactor se alcanzó una eficiencia de remoción del 95%.

Cuando a través de la disminución del TRH se aumentó la carga orgánica por arriba $2.3 \text{ gDQO}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, los microorganismos mostraron incapacidad para degradar los sustratos en corto tiempo, disminuyendo las eficiencias de remoción (74%).

Se encontró que a cargas orgánicas de 4.8 y $6.5 \text{ gDQO}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ el metabolismo bacteriano utilizó preferentemente sustratos fácilmente biodegradables como los alcoholes.

En general, se concluye que este tipo de aguas de desecho puede ser eficientemente tratada por digestión anaerobia, en un proceso continuo a un TRH de 8h y una carga orgánica volumétrica de $2.3 \text{ gDQO}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$.

Al evaluar la capacidad del consorcio para degradar el compuesto más tóxico como fue el ácido acrílico en presencia de alcoholes, se encontró que aunque la velocidad de consumo de este compuesto fue mayor con etanol y butanol, esto no implicó la desaparición de la toxicidad sobre las bacterias utilizadoras de acetato y propionato, como se había inferido. También se encontró que la toxicidad sobre las primeras disminuyó cuando los alcoholes estuvieron presentes, caso contrario en las segundas en las que el efecto tóxico se incrementó. Además de que los periodos de recuperación del metabolismo de estos grupos bacterianos con alcoholes fueron menores que con sustratos como el acetato.

Al mismo tiempo se encontró que el ácido acrílico afectó ligeramente la vía de la β -oxidación del butirato, pero no causó toxicidad sobre bacterias metilotrofas y acetogénicas oxidadoras de butanol.

2. Recomendaciones

La estrategia de adaptación de los microorganismos en el reactor que consistió en adicionar uno a uno los compuestos hasta alcanzar una mezcla compleja, llevó a buenos resultados en términos de eficiencia de remoción. Sin embargo el periodo de adaptación a todos estos requirió de 330 días, por lo que se recomienda el estudiar otra estrategia, que podría ser la adaptación de los microorganismos del reactor con la mezcla de todos los compuestos desde el inicio para tratar de minimizar este periodo.

Se recomienda que una vez con el reactor adaptado, se realicen variaciones de la presencia de algunos compuestos ya sea de estructuras similares o diferentes, en los que cierto tiempo dejen de ser alimentados y nuevamente realimentados para determinar su efecto sobre el comportamiento del reactor, ya que como se planteó en el marco de referencia, las aguas de desecho de este tipo pueden contener mezclas variadas de algunos compuestos.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APHA (1995). Standard methods: For the examination of water and wastewater. 19th edition. Ed. American Public Health Association. Washington, D. C. USA.
- Araya P., Chamy R., Mota M. y Alves M. (2000). Biodegradability and toxicity of styrene in the anaerobic digestion process. *Biotech. Lett.* **22**: 1477-1481.
- Balch W.E., Fox G.E., Magrum L.J., Woese C.R. y Wolfe R. S. (1979). Methanogens: Reevaluation of a unique group. *Microbiol. Rev.* **43** (2): 260-296.
- Battersby N. S. y Wilson V. (1989). Survey of anaerobic biodegradation potential of organic chemical in digesting sludge. *App. Environ. Microbiol.* **55** (2): 433-439.
- Bhatti Z. I., Furukawa K. y Fujita M. (1996). Feasibility of methanolic waste treatment in UASB reactors. *Wat. Res.* **30** (11). pp: 2559-2568.
- Budavari S. (1989). The merck index: An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 11th edition. Ed. Merck & Co., Inc. Rahway, New. Jersey, USA. pp:1606.
- Carey F. A. (1999). Química orgánica. 3a edición. Ed. Mc Graw Hill. Madrid, España. pp:1131.
- Cord-Ruwisch R. y Ollivier B. (1986). Interspecific hydrogen transfer during methanol degradation by *Sporomusa acidovorans* and hydrogenophilic anaerobes. *Arc. Microbiol.* **144**: 163-165.
- Chakraborty R. y Coates J. D. (2004). Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**: 437-446.
- Chou W. L. y Speece R. E. (1978b). Acclimation and degradation of petrochemical wastewater components by methane fermentation. *Biotech. Bioeng. Symp.* **8**: 391-414.
- Chou W., Speece R., Siddiqi H. y McKeon K. (1978a). The effect of petrochemical structure on methane fermentation toxicity. *Prog. Wat. Tech.* **10** (5/6): 545-558.
- Da Silva M. L. B. y Alvarez P. J. J. (2004). Enhanced anaerobic biodegradation of benzene-toluene-ethylbenzene-xylene-ethanol mixture in bioaugmented aquifer columns. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(8): 4720-4726.
- Davel J. Suidan M. T. y Adrian N. (2003). Biodegradation of the energetic compounds TNT through a multiple-stage treatment approach. *Wat. Sci. Technol.* **47**(9):129-135.
- Demirer G. N y Speece R. E. (1999). Inhibitory effects and biotransformation of acrylic acid in computer-controlled pH-stat CSTRs. *Biotechnol. Bioeng.* **62** (2): 200-207.
- Demirer G. N. y Speece R. E. (1997). Anaerobic biotransformation of acrylic acid in UASB reactor: Significance of process staging, physical homogenization of microorganisms and microbial acclimation. *Environ. Technol.* **18**: 111-1121.
- Demirer G. N. y Speece R. E. (1998). Anaerobic biotransformation of four 3-carbon compounds (acrolein, acrylic acid, allyl-alcohol and n-propanol) in UASB reactors. *Wat. Res.* **32** (3): 747-759.
- Diekert G. y Wohlfarth G. (1994). Bioenergetic of acetogenesis from C₁ Units. Part II: Biochemistry and energetics of acetogenesis and the acetyl-CoA pathway. In: *Acetogenesis*. (ed) Drake H. L. Ed. Chapman & Hall. New York, USA. pp:157-175.
- Dietrich C. y Winter J. (1990). Anaerobic degradation of chlorophenol by an enrichment culture. *App. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 253-258.
- Dohányos M., Zábrianska J. y Grau P. (1988). Anaerobic breakdown of acrylic acid. Anaerobic digestion: Proceedings of the 5th international symposium on anaerobic digestion. Italy. pp 287-294.

- Drake H. L. (1994). Acetogenesis, acetogenic bacteria, and the acetyl-CoA “Wood/Ljungdahl” pathway: Past and current perspectives. Part I: Acetogenesis. In: *Acetogenesis*. (ed) Drake H. L. Ed. Chapman & Hall. New York, USA. pp: 1-45.
- Dwyer F. D. y Tiedje M. J. (1983). Degradation of ethylene glycol and polyethylene glycols by methanogenic consortia. *App. Environ. Microbiol.* **46** (1): 185-190.
- Edwards A. E. y Grbić-Galić D. (1994). Anaerobic degradation of toluene and xylene by methanogenic consortium. *App. Environ. Micro.* **60** (1): 313-322.
- Eichler B. y Schink B. (1984). Oxidation of primary aliphatic alcohols by *Acetobacterium carbinolicum* sp. nov., a homoacetogenic anaerobe. *Arch. Microbiol.* **140**:147-152.
- Eichler B. y Schink B. (1985). Fermentation of primary alcohols and diols and pure culture of syntrophically alcohol-oxidizing anaerobes. *Arch. Microbiol.* **143**: 60-66.
- Environmental Health criteria 103 (1990). 2-Propanol. United Nations Environment Programme International Labour Organisation World Health Organization.
- Environmental Health Criteria 191 (1997). Acrylic acid. United Nations Environment Programme International Labour Organisation World Health Organization.
- Environmental Health Criteria 190 (1997). Xylenes. United Nations Environment Programme International Labour Organisation World Health Organization.
- EPA (1994a). Chemical summary for acrylic acid. Office of pollution prevention and toxics. U.S. Environmental Protection Agency.
- EPA (1994b). Chemical summary for methanol. Office of pollution prevention and toxics. U.S. Environmental Protection Agency.
- EPA (1994c). Chemical summary for Styrene. Office of pollution prevention and toxics. U.S. Environmental Protection Agency.
- Fang H. H. P. y Jia X. S. (1999). Formation of interim by products in methanogenic degradation of butyrate. *Wat. Res.* **33** (8): 1791-1798.
- Ferry J. G. (1993). Fermentation of acetate. In: *Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics*. (ed) Ferry J. G. Ed. Chapman & Hall, Inc. New York, USA. pp 304-334.
- Florencio L., Field J. A. y Lettinga G. (1994). Importance of cobalt for individual trophic group in an anaerobic methanol-degrading consortium. *App. Environ. Microbiol.* **60** (1): 227-234.
- Florencio L., Jeniček P., Field J. A. y Lettinga G. (1993). Effect of cobalt on the anaerobic degradation of methanol. *J. Ferment. Bioeng.* **75** (5): 368-374.
- Fox P. y Kheta S. (1996). Anaerobic treatment of high-sulfate wastewater and substrate interactions with isopropanol. *J. Environ. Eng.* **122** (11): 989-994.
- Fuchs G., Mohamed M. E. S., Altenschmidt U., Koch J., Lack A., Brackmann R., Lochmeyer C. y Oswald B. (1994). Biochemistry of anaerobic biodegradation of aromatics compounds. In: *Biochemistry of microbial degradation*. (ed) Ratledge C. Ed. Kluwer Academic Publishers. London. Pp: 513-547.
- Gangolli S. (2005). Dictionary of substances and their effects. 3rd electronic edition. Ed. Royal society of chemistry. <http://www.knovel.com/knovel2/Toc.jsp?BookID=527&VerticalID=0>.
- Gibson J. y Harwood C. (2002). Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 345-69.
- Gonzalez-Gil G., Kleerebezem R. y Lettinga G. (1999). Effects of nickel and cobalt on kinetics of metanol conversión by methanogenic sludge as assessed by on-line CH₄ monitoring. *App. Environ. Microbiol.* **56** (4): 1789-1793.

- Gottschalk G. (1986). Bacterial metabolism. Ed. Springer-Verlag. New York, USA. pp: 359.
- Grbić-Galić D., Churchman E. y Marakovic I. (1990). Microbial transformation of styrene by anaerobic consortia. *J. App. Bact.* **69**: 247-260.
- Hartley W. R. (1990). A toxicological assessment of unleaded gasoline contamination of drinking water. In: *Petroleum contaminated soils*. Chapter 23. Ed. Lewis Publishers, INC. Michigan, USA. Pp:329.
- Heider J. y Fuchs G. (1997). Microbial anaerobic aromatic metabolism. *Anaerobe*. **3**: 1-22.
- Horvath R. S. (1972). Microbial co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature. *Bacteriol. Rev.* **36** (2): 146-155.
- Hyun S. H., Hwang M. H., Jang N. J. y Kim I. S. (2001). The patterns of anaerobic conversion of propionate and ethanol in various enriched culture. 9th World Congress Anaerobic Digestion: Anaerobic Bioconversion for Sustainability. Antwerpen, Belgium. 2-6 de septiembre. pp: 401-403.
- Janssen P. H. (1991). Isolation of *Clostridium propionicum* strain 19acry3 and further characteristics of the species. *Arch. Microbiol.* **155**: 566-571.
- Jenkins S. R., Morgan J. M. y Sawyer C. L (1983). Measuring anaerobic sludge digestion and growth by a simple alkalimetric titration. *J. Water. Pollut. Control Fed.* **55**(5): 448-453.
- Keltjens T. J. y Vogels D. G. (1993). Conversion of methanol and methylamines in methane and carbon dioxide. Part II: Biochemistry. In: *Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics*. (ed) Ferry J. G. Ed. Chapman & Hall, Inc. New York, USA. pp 253-303.
- Kiene R. P. y Taylor B. F. (1989). Metabolism of acrylate and 3-mercaptopropionate. decomposition products of (dimethyl-sulfonio) propionate in anoxic marine sediments. In: *Biogenic sulfur in the environment*. (ed) Cooper W. J. Ed. American chemical society. Washington, D. C, USA. pp: 222-230.
- Kleerebezem R. y Macarie H. (2003). Treating industrial wastewater anaerobic digestión: Comes of age. *Chem. Eng.* **110** (4): 56-64.
- Kleerebezem R., HulshoffPol L. W. y Lettinga G. (1999). Anaerobic biodegradability of phtalic acid and related compounds. *Biodegradation*. **10**: 63-69.
- Liu S. y Suflita J. M. (1994). Anaerobic biodegradation of methyl esters by *Acetobacterium woodii* and *Eubacterium limosum*. *J. Ind. Microbiol.* **13** (5): pp. 321-327.
- Madigan T. M., Martinko M. J. y Parker J. (2004). Brock: Biología de los Microorganismos. Ed. Pearson Educación, S. A. Madrid, España. pp: 1096.
- McInerney M. J., Bryant M. P., Hespell R. B. y Costerton J. W. (1981). *Syntrophomonas wolfei* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**: 1029-1039.
- Medellín J. A (2006). La armada recolectó del mar 30 mil toneladas de basura. El universal online. 27 de febrero. México. <http://www.eluniversal.com.mx/nacion/135603.html>
- Medio Ambiente en Andalucía (2002). La contaminación marina producida por buques. Junta de Andalucía. Consejería del Medio Ambiente. Informe 2002. pp: 33-40. <http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/ima2002>.
- Melgoza R. M., Cruz A. y Buitrón G. (2004). Anaerobic/aerobic treatment of colorants present in textile effluents. *Wat. Sci. Technol.* **50** (2):149-155.

- Merck (2004). Ficha de datos de seguridad para etilenglicol. Conforme a la directiva 91/155/CEE de la comisión. <http://www.chemdat.info>.
- Merck (2004). Ficha de datos de seguridad para metil acetato. Conforme a la directiva 91/155/CEE de la comisión. <http://www.chemdat.info>.
- Monroy H. O. A. (1998). Modelamiento y control de un sistema de digestión anaerobia en dos etapas. Tesis Doctoral. UNAM, México. pp: 159.
- Morrison R. T. y Boyd R. N. (1998). Química orgánica. 5a edición. Ed. Addison-Wesley Longman. México. pp: 1474.
- Müller V., Blaut M. y Gottschalk G. (1993). Bioenergetics of methanogenesis. Part II: Biochemistry. In: *Methanogenesis, ecology, physiology, biochemistry and genetics*. Ed. Ferry G. J. Chapman & Hall, Inc. New York, USA. pp: 360-406.
- OSHA (1996a). Occupational safety and health guideline for acetic anhydride. Occupational Safety and Health Administration. U. S. Department of Labor.
- OSHA (1996b). Occupational safety and health guideline for isopropanol. Occupational Safety and Health Administration. U. S. Department of Labor.
- OSHA (1999). Occupational safety and health guideline for isopropyl acetate. Occupational Safety and Health Administration. U. S. Department of Labor.
- Parekh M., Keith E. S., Daniel S. L. y Drake H. (1992). Comparative evaluation of the metabolic potentials of different strains of *Peptostreptococcus productus*: Utilization and transformation of aromatic compounds. *FEMS Microbiol. Lett.* **94**: 69-74.
- Pipyn P. y Verstraete W. (1981). Lactate and ethanol as intermediates in two-phase anaerobic digestion. *Biotech. Bioeng.* **23** (5): 1145-1154.
- Platen H. y Schink B. (1987). Methanogenic degradation of acetone by an enrichment culture. *Arch. Microbiol.* **149**: 136-141.
- Platen H., Janssen P. H. y Schink B. (1994). Fermentative degradation of acetone by an enrichment culture in membrane-separated culture devices and in cell suspensions. *FEMS Microbiol. Lett.* **122**: 27-32.
- Qu M. y Bhattacharya K. (1996). Degradation and toxic effects of acrylic acid on anaerobic systems. *J. Environ. Eng.* **122** (8): 749-756.
- Rakov D., Doronina N. V., Trotsenko Y. y Alieva R. M. (1991). Growth of methylotrophic bacteria on methylacetate. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **27** (4): 584-588.
- Ronco A., Díaz B. M. C. y Pica G. Y. (2004). Conceptos generales. En: *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas, estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. (ed) Gabriela Castillo. Ed. IMTA: México. pp: 179.
- Schink (1984). *Clostridium magnum* sp. nov. a non-autotrophic homoacetogenic bacterium. *Arch. Microbiol.* **137**: pp:250-255.
- Schink (1994). Isolation, identification, and phylogeny of acetogenic bacteria. In: *Acetogenesis*. (ed) Drake H. L. Ed. Chapman & Hall. New York, USA. pp:200-235.
- Schwartz L. J. (1991). Toxic effects of selected industrial solvents in batch and continuous anaerobic reactors. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **28/29**: 297-305.
- Shelton D. R. y Tiedje M. J. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. *App. Environ. Microbiol.* **47** (4): 850-857.
- Siciliano L. (2000). Contaminación de las aguas. <http://www.ancla.com.ar/Download/Conta>

- minacion.pdf.
- Smallwood I. M. (1996). Handbook of organic solvent properties. Ed. Arnold. Great Britain, London. pp 35-47.
- Smith D. P. y McCarty P. L. (1989). Reduced product formation following perturbation of ethanol and propionate fed methanogenic CSTRs. *Biotechnol. Bioeng.* **34**: 885-895.
- Soubes M. (1994). Microbiología de la digestión anaerobia. Tratamiento anaerobio. III Taller y seminario latinoamericano de tratamiento anaerobio de aguas residuales. Montevideo, Uruguay. pp: 15-28.
- Speece R. E. (1996). Anaerobic biotechnology: For industrial wastewater. Ed. Archea Press, Nashville, Tennessee, USA. pp 274-286.
- Stams A. J. M. y Plugge C. M. (1994). Occurrence and function of the acetyl-CoA cleavage pathway in a syntrophic propionate oxidation. Part V: Acetogenic processes in other bacterial groups. In: *Acetogenesis*. (ed) Drake, H. L. Ed. Chapman & Hall. New York, USA. pp: 557-564.
- Staples C. A., Murphy S. R., McLaughlin J. E., Leung H. W., Cascieri T. C. y Farr C. H. (2000). Determination of selected fate and aquatic toxicity characteristics of acrylic acid and a series of acrylic esters. *Chemosphere.* **40**: 29-38.
- Strand S. (2005). Anaerobic degradation of aromatics compounds: ring cleavage without oxygen. <http://www.cfr.washington.edu/classes/esc.518/Lectures/anaer%20Ring%20cleavage.pdf>.
- Tarvin D. y Buswell M. A. (1934). The methane fermentation of organic acids and carbohydrates. *J. Am. Chem. Soc.* **56**: 1751-1755.
- Thauer R. K., Hedderich R. Fischer R. (1993). Reactions and enzymes involved in methanogenesis from CO₂ and H₂. Part II. Biochemistry. In: *Methanogenesis, ecology, physiology, biochemistry and genetics*. Ed. Ferry G. J. Chapman & Hall, Inc. New York, USA. pp: 207-252.
- Thauer R. K. (1998). Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiol.* **144**: 2377-2406.
- Thauer R. K., Jungermann K. y Decker K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **41**(1). pp: 100-180.
- Thauer R. K., Möller-Zinkhan D. y Spormann A. M. (1989). Biochemistry of acetate catabolism in anaerobic chemotrophic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**: 43-67.
- Tschech A. y Pfennig N. (1984). Growth yield increase linked to caffeate reduction in *Acetobacterium woodii*. *Arch. Microbiol.* **137**: 163-167.
- van Lier J. B., Grolle K. C. F., Frijters C. T. M., Stams A. J. M. y Lettinga G. (1993). Effects of acetate, propionate, and butyrate on the thermophilic anaerobic degradation of propionate by methanogenic sludge and defined cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** (4): 1003-1011.
- Visser A. (1995). The anaerobic treatment of sulfate-containing wastewater. Ph.D. Thesis. Wageningen Agricultural University. Holanda.
- WA (1997). Acrylic acid manufacture in Western Australia. <http://www.chemlink.com.au/acryfull.htm>
- Wade L. G. (1993). Química orgánica. Ed. Prentice Hall. México. pp: 1312.
- Widdel F. (1986). Growth of methanogenic bacteria in pure culture with 2-propanol and other alcohols as hydrogen donors. *App. Environ. Microbiol.* **51**(5): 1056-1062.

- Zandvoort M. H., Geerts R., Lettinga G. y Lens P. N. L. (2002). Effect of long-term cobalt deprivation on methanol degradation in a methanogenic granular sludge bioreactor. *Biotechnol. Prog.* **18**: 1233-1239.
- Zheng Z., Breedveld G. y Aagaard P. (2001). Biodegradation of soluble aromatic compounds of jet fuel under anaerobic conditions: laboratory batch experiments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**: 572-578.

Publicación relacionada con la tesis

P. Castilla, A. Leyva, U. García, O. Monroy and M. Meraz. (2005). Treatment of a low concentration industrial chemicals mixture in an UASB reactor. *Water Science and Technology*. 52 (1-2): 385-390.

Treatment of a low concentration industrial chemicals mixture in an UASB reactor

P. Castilla, A. Leyva, U. García, O. Monroy and M. Meraz

Department of Biotechnology, Universidad Autónoma Metropolitana, A.P. 55-535, 09340 Iztapalapa, D.F. México (E-mail: *p_castilla@hotmail.com*, *duma*, *monroy* and *meraz@xanum.uam.mx*)

Abstract A wastewater containing a mixture of methanol, isopropyl alcohol, ethylene glycol, acetic anhydride, methyl, ethyl and isopropyl acetate, acrylic acid, butyl and methyl acrylate, *o*, *m* and *p*-xylene and styrene was fed to an UASB reactor. Isopropanol addition diminished the removal efficiency to 60% and required a long adaptation time for its total mineralization. When acrylic acid was added to the mixture, the removal dropped to 83% and recovered after 40 days. As for the rest of the substrates, *p-m-o*-xylene addition had no effect on reactor performance, although in batch assays it showed low mineralization. Also the effect of volumetric organic load on removal efficiency was followed up. After diminishing the HRT to 4 and 3 h yielding 4.8 and 6.5 gCOD L⁻¹ d⁻¹, removal efficiencies decreased to 79 and 74% respectively.

Keywords Complex wastewater; degradation; methanogenesis; UASB reactor

Introduction

Low concentration wastewaters from washing and rinsing operations of containers carrying petrochemicals derivatives (alcohols, acetic and acrylic acid esters, aromatics) have to be treated before being disposed. Anaerobic digestion is a suitable option for the biodegradation of these chemicals, since the mineralization pathways of several of them are well known. Among alcohols, the methanol methanization has been extensively reported (Keltjens and Vogels, 1993), as the effect of cobalt and nickel (Florescencio *et al.*, 1993, 1994; Gonzalez *et al.*, 1999), the preferential pathway as a function of pH and organic load (Bhatti *et al.*, 1996). Widdel (1986) reported that isopropyl alcohol is oxidized to acetone and that has been mineralized in 56% in a CSTR at a rate of 0.5 g L⁻¹ d⁻¹ after 90 days of sludge acclimation (Chou and Speece, 1978), while in batch tests at concentrations ranging from 0.5 to 15 g L⁻¹, an 11.5% conversion to methane was the highest attained (Fox and Ketha, 1996). Dwyer and Tiedje (1983) found that 2.5 g L⁻¹ of ethylene glycol were transformed to acetate and ethanol at equimolar ratios and ethanol was further converted to acetate and hydrogen. A marine strain isolated by Eichler and Schink (1985) growing on ethylene glycol at 0.62 g L⁻¹ d⁻¹ yielded the same intermediaries.

All esters will be hydrolyzed to an organic acid and a primary alcohol prior to undergo mineralization and their intermediaries will often be less toxic than the original compound as in the case of isopropyl acetate that yielded isopropyl alcohol and acetate (Fox and Ketha, 1996). At an OLR of 0.5 g L⁻¹ d⁻¹ methyl and ethyl acetates were 96% removed (Chou and Speece, 1978). Acrylic acid can be fermented to acetate and propionate by *Clostridium propionicum* 19acry3 (Jansen, 1991) but is a well known inhibitor of methanogenic activity. Chou *et al.* (1978) found an IC₅₀ of 0.86 g L⁻¹ while 0.2 g L⁻¹ was found by Speece (1996). After long acclimatization periods it has been partially removed (21%) in continuous reactors at a rate of 0.5 g L⁻¹ d⁻¹ (Chou and Speece, 1978). It completely inhibited propionate and partially inhibited acetate utilization of unacclimated cultures. An acidogenic chemostat, fed on glucose, was able to remove it at 0.416 g L⁻¹ d⁻¹, six times higher than with a sludge degrading acetate (Qu and Bhattacharya, 1996). Acrylic acid at 1.4 g L⁻¹ d⁻¹ was efficiently transformed to methane in reactors in series (Demirer and

Speece, 1997). A 98% removal efficiency of a mixture of methyl, ethyl and butyl acrylate at concentrations below 1 g L^{-1} and enriched with 10 g L^{-1} of acetic acid was obtained by Dohányos *et al.* (1988).

On the other hand, *o*-xylene was mineralized after 255 days, the maximum substrate concentration degraded was 0.21 g L^{-1} , while *m* and *p*-xylene were not degraded (Edwards and Grbić-Galić, 1994). Even after 500 days, 0.15 g L^{-1} of *p*-xylene were not mineralized (Kleerebezem *et al.*, 1999). Grbić-Galić *et al.* (1990), found that styrene at concentrations ranging from 0.01 to 1.04 g L^{-1} was transformed to a variety of intermediaries including VFA and CO_2 , with no methane formation while Araya *et al.* (2000) showed that at 0.2 g L^{-1} it was 74% mineralized, however it was not degraded in an industrial wastewater at 6 mg L^{-1} which also contained acrylates and detergents.

It has been pointed out that some alcohols can be fully degraded and mineralized, as well as some acetic acid esters, while acrylates and aromatics are toxic and of difficult mineralization. These chemicals are frequently discarded together. In order to propose handling policies and suitable treatment processes, research on the biodegradation of mixtures of those compounds has been made through the continuous anaerobic treatment of a mixture of some selected chemical compounds, as well as the evaluation of the effect of volumetric organic loading rates increase by decreasing HRT, on removal efficiency.

Material and methods

A 1.4 L UASB reactor was inoculated with sludge (22 g VSS L^{-1}) from a municipal wastewater treatment plant. The reactor was operated at $2 \text{ g COD L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, $0.25 \text{ g COD g VSS}^{-1} \text{ d}^{-1}$ and 12 h HRT. Balch *et al.* (1979) mineral solutions were used. The chemicals were added in subsequent stages as shown in Table 1, and the COD concentration of each chemical was amended to keep the same proportion of each one in the mixture. To observe the effect of a new chemical added on performance, a removal efficiency higher than 90% was allowed before the addition of another one.

As soon as the mixture of 14 chemicals was complete and once the reactor showed high removal levels, the HRT was diminished from 12 to 8, 6, 5, 4 and 3 hours. The reactor was followed up by daily COD, pH, alkalinity ratio, biogas amount and composition determinations. During HRT stages of 3 and 4 h, the chemicals in the effluent were followed up by FID-GC analysis. The mean and standard deviation was estimated from nine samples at each HRT.

Biodegradability assays for AA and PX, MX, OX, were carried out in serological bottles inoculated with sludge from the reactor and mineral solutions, incubated at 35°C .

Table 1 Staged feeding strategy of the UASB reactor

Stage	Chemicals fed	Nomenclature	(g COD _{red} L ⁻¹) ^a
I	Methanol	MH	1.00
II	Isopropyl alcohol+acetic anhydride	IH+AE	0.33
III	Butyl acrylate	BA	0.25
IV	Methyl acrylate	MA	0.2
V	Methyl acetate	ME	0.165
VI	Acrylic acid	AA	0.14
VII	Ethyl acetate+isopropyl acetate	EE+IE	0.11
VIII	Ethylene glycol	GH	0.1
IX	<i>p</i> -Xylene	PX	0.09
X	<i>m</i> -Xylene	MX	0.08
XI	<i>o</i> -Xylene	OX	0.075
XII	Styrene	ST	0.071

^aEach chemical concentration to make up 1 g L^{-1}

The AA concentrations were of 71 and 350 mg COD L⁻¹ while for PX, MX, OX they were of 133, 56, and 85 mg COD L⁻¹ respectively.

Results and discussion

During start up (Figure 1), the reactor was fed with MH reaching 95% removal efficiencies with a methane production of 0.83 gCH₄-COD L⁻¹ d⁻¹. In the second stage, a mixture of IH and AE was added to MH, leading to a slight acidification, methane production decreased and removal efficiency dropped around 60%. After 43 days removal efficiency reached 98% suggesting that sludge acclimation to acetone took between 28 to 35 days, similar to what Platen and Schink (1987) found. BA incorporation in stage III had no effect on performance. MA addition at the beginning of stage IV, made the removal efficiency drop to 85% followed by a fast recovery, up to 92%. In this stage, 23% of the total COD (0.165 g L⁻¹) corresponded to acrylic acid as intermediary. When ME was added to the mixture, around day 145, COD removal remained constant and mineralization increased slightly (1.16 gCOD-CH₄ L⁻¹ d⁻¹).

Acrylic acid addition in stage VI decreased removal efficiency to 83% and also granulation loss was found, leading to an increase in suspended solids in the effluent (from 25 to 46 mg L⁻¹). In this stage, acrylic acid in the mixture was around 0.214 g L⁻¹, near the IC₅₀ value reported by Speece (1996), and mineralization of its intermediaries, acetate and propionate, was inhibited yielding an important acidification. After 40 days the reactor recovered and the average methane was of 1.31 gCOD-CH₄ L⁻¹ d⁻¹ at higher AA loading rates than those reported by Qu and Bhattacharya (1996) between 16.7–66.7 mg L⁻¹ d⁻¹ for a methanogenic reactor.

At the end of this stage, AA biodegradability tests showed a specific activity of 0.124 g CH₄-COD g VSS⁻¹ d⁻¹ in 24 hours. In a second test the sludge fed was increased five times, which was transformed mainly to propionate and in a smaller amount, to acetate. Methane production began until AA was completely consumed, after 50 hours, and specific activity was of 0.025 gCH₄-COD gVSS⁻¹ d⁻¹.

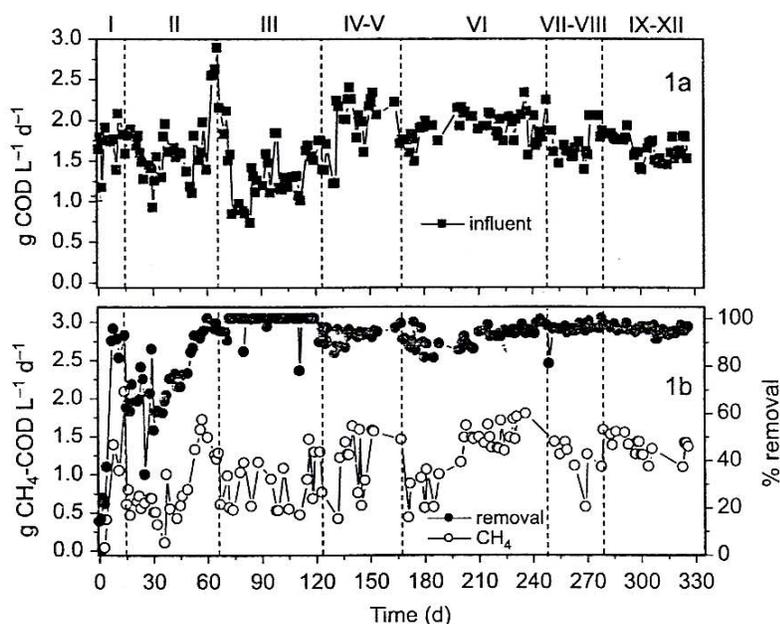


Figure 1 Reactor performance for the chemicals mixture; OLR (1a); removal efficiency and methane production (1b)

The addition of EE and IE in stage VII, had no effect on the removal efficiency, indicating a proper acclimation to all compounds added before. Also, isopropyl alcohol and acetate from IE hydrolysis were totally consumed due to the acclimation of these intermediaries in stage II. In stage VIII (262 days), GH was added and a methane production instability was observed to reach a mean value of 0.98 gCOD-CH₄L⁻¹d⁻¹, although this substrate is easily transformed to ethanol, acetate and hydrogen in batch and continuous reactors (Dwyer and Tiedje, 1983; Eichler and Schink, 1985).

When PX, MX, OX and ST were added, (stages IX to XII), no effect was detected on removal efficiencies which remained at 93%. In batch tests, xylenes were scantily mineralized and their concentration diminished, indicating a primary transformation only (Table 2), similar to what was found by Edwards and Grbić-Galić (1994) and Kleerebezem *et al.* (1999).

When the mixture was complete, the reactor was still operated for 21 days at 12 hours HRT. Then it was diminished to 8 hours increasing the OLR to 2.3 gCOD L⁻¹ d⁻¹ (Figure 2a).

As the OLR was increased by reducing the HRT, the efficiency dropped and methanization rate increased (Figure 2b).

Table 2 Transformation rate and mineralization of xylenes in batch test

	Substrate fed		Transformed substrate (%)	Transformation rate (mg COD L ⁻¹ d ⁻¹)	Mineralization (%)
	(mg L ⁻¹)	(mg COD L ⁻¹)			
<i>p</i> -xylene	41.9	132.9	67.1	6.2	13.3
<i>m</i> -xylene	17.7	56.1	48.1	4.6	36.4
<i>o</i> -xylene	26.7	84.6	44.8	3.6	37.9

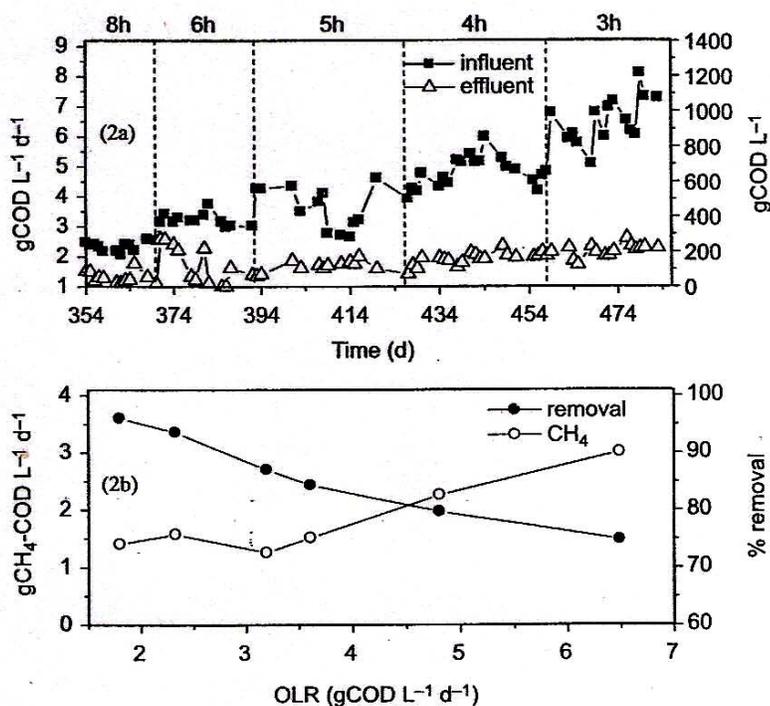


Figure 2 Reactor performance during HRT reductions. OLR and effluent concentration (2a). Methane productivity and removal efficiency against OLR (2b)

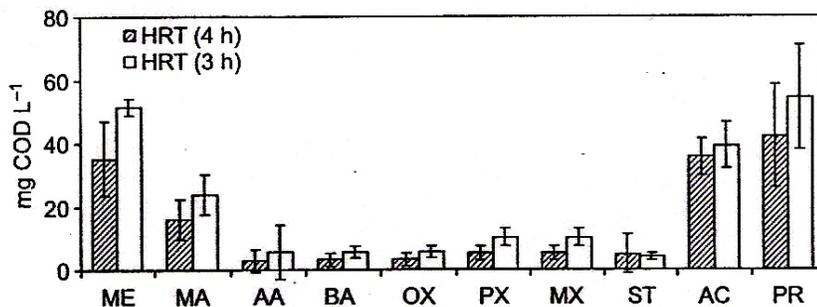


Figure 3 Chemicals detected in the reactor effluent of the 4 and 3 hours HRT; AC (acetate), PR (propionate)

Figure 3 shows that ME, MA and intermediaries as acetate and propionate were the main substrates found in the effluent at the highest organic loading rates. Also, small amounts of OX, PX, MX and ST, were detected.

All of them represented 16–21% at both HRT, of the concentration fed. Around 32% of acrylates and acrylic acid fed were detected. Only alcohols were degraded under these low HRT conditions.

Conclusions

Removal efficiency of the mixture fed to the reactor was around a mean value of 95% while mineralization remained around 66%, indicating the lack of quantification of some compounds due to volatilization. Some chemicals such as methyl acrylate and ethylene glycol led to short instability in reactor performance. Isopropanol and acrylic acid showed an effect on removal and recovery which was longer than that of other chemicals. Due to toxicants loading rate at lower HRT, removal efficiency decreased and mineralization remained around 50%. When the reactor was stressed by HRT decrease, sludge activity shifted to the preferential utilization of alcohols rather than VFA as acetate and propionate, indicating that acetogenic and acetoclastic bacteria were affected by loading rate of some substrates and intermediaries.

Acknowledgements

This work was financed by the Mexican Petroleum Institute and the National Council for Science and Technology (CONACyT). We wish to thank M. B. Carmen Fajardo for the analytical support.

References

- Araya, P., Chamy, R., Mota, M. and Alves, M. (2000). Biodegradability and toxicity of styrene in the anaerobic digestion process. *Biotech. Lett.*, **22**, 1477–1481.
- Balch, W.E., Fox, G.E., Magrum, L.J., Woese, C.R. and Wolfe, R.S. (1979). Methanogens: reevaluation of a unique group. *Microbiol. Rev.*, **43**(2), 260–296.
- Bhatti, Z.I., Furukawa, K. and Fujita, M. (1996). Feasibility of methanolic waste treatment in UASB reactors. *Wat. Res.*, **30**(11), 2559–2568.
- Chou, W.L. and Speece, R.E. (1978). Acclimation and degradation of petrochemical wastewater components by methane fermentation. *Biotech. Bioeng. Symp.*, **8**, 391–414.
- Chou, W.L., Speece, R.E., Siddiqui, R.H. and McKeon, K. (1978). The effect on petrochemical structure on methane fermentation toxicity. *Prog. Wat. Tech.*, **10**(5/6), 545–558.
- Demirer, G. and Speece, R. (1997). Anaerobic biotransformation of acrylic acid in UASB reactors: significance of process staging, physical homogenization of microorganisms and microbial acclimation. *Environ. Technol.*, **18**, 1111–1121.

- Dohányos, M., Zábianska, J. and Grau, P. (1988). Anaerobic breakdown of acrylic acid. In *Proceedings of the 5th international Symposium on Anaerobic Digestion, Bologna, Italy*, Pergamon, Oxford, pp. 287–294.
- Dwayer, F.D. and Tiedje, M.J. (1983). Degradation of ethylene glycol and polyethylene glycols by methanogenic consortia. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**(1), 185–190.
- Edwards, A.E. and Grbić-Galić, D. (1994). Anaerobic degradation of toluene and xylene by methanogenic consortium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**(1), 313–322.
- Eichler, B. and Schink, B. (1985). Fermentation of primary alcohols and diols and pure culture of syntrophically alcohol-oxidizing anaerobes. *Arch. Microbiol.*, **143**, 60–66.
- Florencio, L., Field, J.A. and Lettinga, G. (1994). Importance of cobalt for individual trophic groups in an anaerobic methanol-degrading consortium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**(1), 227–234.
- Florencio, L., Jeniček, P., Field, J.A. and Lettinga, G. (1993). Effect of cobalt on the anaerobic degradation of methanol. *J. Ferment. Bioeng.*, **75**(5), 368–374.
- Fox, P. and Ketha, S. (1996). Anaerobic treatment of high-sulfate wastewater and substrate interactions with isopropanol. *J. Environ. Eng.*, **122**(11), 989–994.
- Gonzalez-Gil, G., Kleerebezem, R. and Lettinga, G. (1999). Effects of nickel and cobalt on kinetics of methanol conversion by methanogenic sludge as assessed by on line CH₄ monitoring. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**(4), 1789–1793.
- Grbić-Galić, D., Churchman-Eisel, N. and Maraković, I. (1990). Microbial transformation of styrene by anaerobic consortia. *J. Appl. Bacteriol.*, **69**, 247–260.
- Janssen, P.H. (1991). Isolation of *Clostridium propionicum* strain 19acry3 and further characteristics of the species. *Arch. Microbiol.*, **155**, 566–571.
- Keltjens, T.J. and Vogels, D.G. (1993). Conversion of methanol and methylamines in methane and carbon dioxide, Part II: biochemistry. In *Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics*, Ferry, J.G. (ed.), Chapman & Hall, New York, pp. 253–303.
- Kleerebezem, R., Hulshoff Pol, L.W. and Lettinga, G. (1999). Anaerobic biodegradability of phthalic acid and related compounds. *Biodegradation*, **10**, 63–69.
- Platen, H. and Schink, B. (1987). Methanogenic degradation of acetone by an enrichment culture. *Arch. Microbiol.*, **149**, 136–141.
- Qu, M. and Bhattacharya, K. (1996). Degradation and toxic effects of acrylic acid on anaerobic systems. *J. Environ. Eng.*, **122**(8), 749–756.
- Speece, R.E. (1996). *Anaerobic Biotechnology*, Archae Press, Nashville, Tennessee, WA, pp. 274–275.
- Widdel, F. (1986). Growth of methanogenic bacteria in pure culture with 2-propanol and other alcohols as hydrogen donors. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**(5), 1056–1062.