



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

**METANIZACIÓN Y MINERALIZACIÓN DEL
2-CLOROFENOL EN CONDICIONES METANOGENICAS**

TESIS

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

PRESENTA

J.B.J. Lizeth Maribel Beristain Montiel

COMITE TUTORIAL

Directora: *Dra. Florina Ramírez Vives*

Asesora: *Dra. Flor de Ma. Cuervo López*

México D.F

Abril 2008

Iztapalapa, D.F a 25 de Marzo de 2008

AGRADECIMIENTOS

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

Agradecimientos a la dirección de la Dra. Florina Ramírez durante la escritura y evaluación de la tesis.

**METANIZACIÓN Y MINERALIZACIÓN DEL 2-CLOROFENOL EN
CONDICIONES METANOGÉNICAS**

A la Dra. Flor de María Cuervo, por su aportación y apoyo técnico por brindarme sugerencias durante el desarrollo de la tesis y la asesoría en el

Que presentó

I.B.I Lizeth Maribel Beristain Montiel

Al jurado que revisó este trabajo por sus comentarios y sugerencias

Comité tutorial

Dra. Florina Ramírez Vives

Directora, UAM- Iztapalapa

A los compañeros y amigos de la UAM- Iztapalapa que me brindaron su apoyo y colaboración durante el desarrollo de la tesis

Dra. Flor de Ma. Cuervo López

Asesora, UAM – Iztapalapa

Que gracias a ellos las cosas han salido mejor y más rápido

H. Jurado

Presidenta: Dra. Flor de Ma. Cuervo López
UAM-Iztapalapa



Secretaría: Dra. Anne Claire Texier Valentine
UAM-Iztapalapa

Texier

Vocal: Dra. Patricia Castilla Hernández
UAM-Xochimilco

Patricia Castilla

Vocal: Dr. Germán Buitrón Méndez
INSTITUTO DE INGENIERÍA-UNAM



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la dirección de la Dra. Florina Ramírez durante la escritura y la evaluación de esta tesis, gracias por su apoyo y horas de dedicación.

A la Dra. Flor de Maria Cuervo, por su aportación a este trabajo, por brindarme sugerencias durante la parte experimental y la escritura de la tesis.

Al jurado que revisó este trabajo por sus comentarios y sugerencias.

A los compañeros y amigos del laboratorio de tratamiento de aguas residuales, Joe, Ulises, Uriel, Miguel, Vianey, Rodrigo, Ulises G., Hector, ya que gracias a ellos las horas de trabajo fueron amenas.

A los compañeros de generación ya que compartimos experiencias que ayudaron a superar esta etapa.

Dedicatorias:

A mis padres

Por su apoyo incondicional, ya que gracias a ellos he logrado ser quien soy.

A mis hermanas

Por su amistad, apoyo en todos los sentidos y claro por compartir una vida conmigo.

ÍNDICE

Índice de tablas	VII
Índice de figuras	VIII
Resumen	IX
Abstract	X
1 Marco teórico	1
1.1 Respiración anaerobia	1
1.1.1 Respiración anaerobia metanogénica	1
1.2 Distribución de clorofenoles	3
1.2.1 Propiedades fisicoquímicas del 2-clorofenol (2-CP)	4
1.2.2 Toxicidad del 2-Clorofenol	5
1.3 Eliminación del clorofenoles	6
1.3.1 Decloración reductiva	7
1.3.2 Respiración aerobia	12
1.3.3 Sistemas anaerobio/aerobio	15
1.3.4 Efecto del oxígeno en cultivos anaerobios	16
2 Justificación	19
3 Objetivo	19
3.1 Objetivo general	19
3.2 Objetivos particulares	19
4 Materiales y métodos	21
4.1 Materiales	21
4.1.1 Reactor metanogénico UASB y fuente de inóculo	21
4.1.2 Medio de cultivo	22
4.1.3 Cinéticas anaerobia	22
4.1.3.1 Pruebas abióticas con el 2-CP	23
4.1.3.2 Actividad metanogénica	23
4.1.3.3 Pruebas para la elección de la concentración de 2-CP	24

4.1.3.4	Prueba con donadores de electrones y atmósferas.	24
4.1.3.5	Prueba con 2-CP en 50 y 80 días de aclimatación	25
4.1.4	Cinéticas con oxígeno	26
4.1.4.1	Cinética de mineralización del 2-CP en presencia de O ₂ .	26
4.2	Métodos analíticos	27
4.2.1	Cuantificación de 2-CP, fenol y benzoato	28
4.2.2	Determinación de (CH ₄ y CO ₂) por cromatografía de gases	29
4.2.3	Determinación de carbono total y carbono inorgánico	30
4.2.4	Determinación de acetato por cromatografía de gases	31
4.2.5	Determinación de DQO soluble por la técnica de flujo cerrado	32
5	Resultados y discusión	33
5.1	Cultivo en continuo	33
5.1.1	Reactor metanogénico	33
5.2	Cultivos en lote	34
5.2.1	Prueba de actividad metanogénica	34
5.3	Pruebas abióticas de volatilidad y adsorción	35
5.4	Prueba para la elección de la concentración de trabajo de 2-CP	36
5.5	Efecto de diferentes donadores de electrones en la mineralización de 2-CP	39
5.6	Prueba de mineralización del 2-CP en 50 y 80 días de aclimatación	43
5.7	Cinéticas en lote con oxígeno	46
5.7.1	Cinéticas de mineralización de 2-CP en presencia de oxígeno	46
6	Conclusiones	52
7	Bibliografía	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Propiedades fisicoquímicas del 2-CP	5
Tabla 2	Aceptores de electrones para diferentes microorganismos anaerobios	7
Tabla 3	Velocidades de consumo de clorofenoles en condiciones anaerobias.	9
Tabla 4	Medio mineral Visser	22
Tabla 5	Elementos traza	22
Tabla 6	Diseño experimental para la prueba de actividad metanogénica.	23
Tabla 7	Diseño de la cinética de 2 clorofenol a 10, 50 y 500 mg/L.	24
Tabla 8	Diseño de la cinética de 2 clorofenol, para evaluar el efecto de diferentes donadores	25
Tabla 9	Diseño de la cinética de 2 clorofenol, para evaluar el efecto de la aclimatación	25
Tabla 10	Diseño de la cinética de mineralización del 2-CP en presencia de oxígeno	26
Tabla 11	Métodos analíticos	27
Tabla 12	Promedios de pendientes de la recta y coeficientes de correlación de los métodos analíticos	27
Tabla 13	Porcentaje de volatilización y adsorción del 2-CP	35
Tabla 14	Eficiencia, rendimiento y velocidades a cada una de las concentraciones de 2-CP	38
Tabla 15	Eficiencia, rendimiento y velocidad de consumo del 2-Clorofenol	42
Tabla 16	Variables de respuesta de las cinéticas de adaptación del lodo al 2-CP.	44
Tabla 17	Variables respuesta de las cinéticas en la primera alimentación de 2-CP, con O ₂	48
Tabla 18	Porcentaje de formación de fenol en cada tratamiento.	49
Tabla 19	Balance de carbono final de la cinética en presencia de oxígeno	49
Tabla 20	Variables respuesta de las cinéticas en la primera, segunda alimentación de 2-CP, con O ₂	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	1	Esquema de digestión anaerobia	3
Figura	2	Posibles rutas de biotransformación del 2-CP en un lodo anaerobio.	10
Figura	3	Ruta de degradación aerobia	13
Figura	4	Bicapa formada en un lodo granular	17
Figura	5	Reactor UASB.	21
Figura	6	Curvas de calibración de 2-CP, fenol y benzoato	28
Figura	7	Curva estándar de metano y dióxido de carbono por CG-TCD	29
Figura	8	Curva estándar de carbono orgánico total por TOC	30
Figura	9	Curva estándar de acetato por CG-FID	31
Figura	10	Curva estándar de DQO	32
Figura	11	Carbono alimentado, velocidad de consumo y producción de biogás	33
Figura	12	Prueba de actividad metanogénica de inóculo con acetato y glucosa	34
Figura	13	Consumo de 2-CP a concentraciones de 10 y 50 mg 2-CP/L, con acetato (c/a) y sin acetato (s/a).	36
Figura	14	Producción de biogás en presencia y ausencia de acetato a concentraciones de 10 y 50 mg 2-CP/L	37
Figura	15	Comportamiento del 2-CP y producción de biogás en presencia y ausencia de acetato a 500 mg 2CP/L	37
Figura	16	Consumo de 2-CP y producción de biogás, con acetato y dióxido de carbono como atmósfera.	39
Figura	17	Consumo de 2-CP, producción de biogás en presencia y ausencia de acetato, en atmósfera de nitrógeno.	40
Figura	18	Consumo de 2-CP, producción de biogás con fenol como donadores de electrones en atmósfera de helio	41
Figura	19	Consumo de 2-CP y acetato, producción de fenol y biogás en una segunda alimentación de 2-CP	43
Figura	20	Consumo de 2-CP, producción de fenol en una tercera alimentación de 2-CP	44
Figura	21	Consumo de 2-CP, en la primera alimentación de 2-CP, en presencia de oxígeno	46
Figura	22	Producción de fenol en la primera alimentación de 2-CP, en presencia de oxígeno	47
Figura	23	Producción de biogás con inóculo sin aclimatar a 2-CP, en presencia de oxígeno.	47
Figura	24	Consumo de 2-CP, con el inóculo aclimatado por 40 días al 2-CP y oxígeno	50
Figura	25	Producción de biogás con el inóculo aclimatado por 40 días al 2-CP y oxígeno	50

RESUMEN

El presente trabajo pretende contribuir al conocimiento que se tiene sobre la eliminación del 2-clorofenol (2-CP) en condiciones metanogénicas. El trabajo se dividió en dos partes. Una en la que se estudió el efecto de la aclimatación, la adición de donadores de electrones y el cambio de atmósfera en la metanización y mineralización del 2-CP. Como donadores de electrones se utilizaron acetato y fenol en relación estequiométrica con el 2-CP, atmósferas de nitrógeno, dióxido de carbono y helio y tiempos de aclimatación de 50 y 80 días; la concentración de 2-CP utilizada fue de 50 mg/L. En la segunda parte se evaluó el efecto del oxígeno (0.5-2 mg O₂/L) y la aclimatación (50 días) en la metanización y mineralización del 2-CP. Todos los ensayos se llevaron a cabo en lote en botellas serológicas de 60 mL, utilizando como inóculo lodo metanogénico en estado estacionario proveniente de un reactor UASB.

En la primera parte se encontró fenol en todas las pruebas como intermediario por lo que el primer paso para la eliminación del 2-CP fue la dechloración reductora, además, se detectó metano y dióxido de carbono como evidencia de la metanización y mineralización del compuesto.

La aclimatación no afectó a la eficiencia de consumo (84%) ni al rendimiento de producción de biogas (0.7± 0.12) ya que no se observó diferencia significativa entre cada uno de los tiempos de aclimatación y el control (sin aclimatación). En contraste, la fase de retardo se redujo en un 62.5% en comparación con el control. La velocidad específica de consumo (q_s) del 2-CP del control fue de 0.0014±0.0005 mg C/g SSV·d, este valor se incrementó en un 57% y 114% en un tiempo de aclimatación de 50 y 80 días respectivamente.

Con respecto a los donadores de electrones, se observó que el consumo de acetato fue de forma independiente al del 2-CP y se llevó a cabo en los primeros días, al mismo tiempo que se observó incremento en la formación de biogás. Además, no se presentó diferencia significativa en el rendimiento, eficiencia y velocidades de consumo al adicionarlo con respecto al control (sin acetato). Con la adición de fenol no se presentó una fase de retardo, además, se observó un incremento en la velocidad de consumo (0.003 a 0.0044±0.0005 mg C consumido/g SSV·d) con respecto al control. Estos resultados dan evidencia de que el fenol puede actuar como donador de electrones en la dechloración reductiva y mejorar la velocidad de consumo del 2-CP.

Sobre las atmósferas, se observó que el dióxido de carbono reduce la eficiencia de consumo del 2-CP debido probablemente a un cambio en la ruta metabólica provocado por la producción de otro tipo de intermediarios, el nitrógeno y helio no influyen sobre el consumo del 2-CP ya que no se presenta diferencia entre los perfiles de consumo.

En la segunda parte, las eficiencias de consumo (92%) y velocidades específicas de consumo (0.0015±0.0003 mg C/g SSV·d) no presentaron diferencia significativa con la adición de oxígeno, ya que los valores son similares a los del control (sin oxígeno). En la máxima concentración de oxígeno la producción de metano ($Y_{Metano/S}$) y fenol disminuyeron en un 50% y 42% respectivamente, mientras que el rendimiento de producción de dióxido de carbono (Y_{CO_2}) se incrementó en comparación con el control metanogénico, además, se detectó en el balance de materiales una fracción de carbono faltante (26%) lo cual sugiere la formación de un intermediario formado en una vía metabólica alterna. Con el tiempo de 40 días de aclimatación al 2-CP y oxígeno, el periodo de consumo se redujo en un 50% y la velocidad específica de consumo aumentó un 73%.

ABSTRACT

The aim of this study is to contribute to the knowledge about 2-Chlorophenol degradation under methanogenic conditions. This work was divided in two parts. The first part was focused on evaluating the effect of the acclimatization, addition of electron donors and the atmosphere during mineralization and methanization of 2-CP. Acetate and phenol were used as electron donors in stoichiometric relation with 2-CP. Nitrogen, carbon dioxide and helium were the atmosphere assessed; 50 and 80 days were the acclimatization times. In all cases the concentration of 2-CP used was 50 mg/L. The second part evaluated the effect of several oxygen concentrations (0.5 – 2 mg O₂/L) and the acclimatization (50 days) during 2-CP mineralization and methanization. All the assays were performed in batch cultures using 60 mL serological bottles and adding as inoculum methanogenic sludge in steady state obtained from an UASB reactor.

In all the experiments phenol was found as intermediary due to reductive dechlorination of 2-CP. Likewise, methane and carbon dioxide were detected indicating mineralization and methanization of 2-CP.

In the first part, no effect of sludge acclimatization was observed on 2-CP consumption efficiency (84%) or production yield (0.7± 0.12). However, the lag phase was reduced in 62.5% if compared with the control. Likewise, the 2-CP specific consumption rate (q_s) of the control was 0.0014 ± 0.0005 mg C/g VSS*d, this value was increased in 57% and 114% for acclimatization times of 50 and 80 days respectively, In reference to electron donors, it was observed that acetate consumption was independent of 2-CP consumption. No significant variation in yield products, consumption efficiencies and specific rates were observed if compared to the control assay without acetate. In contrast, no lag phase was observed when phenol was used resulting in an increase in the specific consumption rate (0.003 to 0.0044 ± 0.0005 mg C consumed / g VSS * d).

Results concerning to atmospheres showed that carbon dioxide reduce consumption efficiency probably by a change in the metabolic pathway is given. The change is originated due to the production of other intermediaries; nitrogen and helium don not influence the 2-CP consumption because we had not observed difference among the consumption profiles.

In the second part, no effect of oxygen on consumption efficiencies (92%) and specific consumption rates (0.0015 ± 0.0003 mg C/ VSS*d) was observed. At the highest concentration of oxygen assayed, methane and phenol production ($Y_{\text{METANO/S}}$) decreased in 50% and 42% respectively while the yield of carbon dioxide (Y_{CO_2}) increased compared to the methanogenic control without oxygen. The material balance suggested formation of an intermediary within an alternating metabolic pathway. Consumption period was diminished in 50% and the specific consumption rate increased in 73% when acclimatization sludge for 2-CP and oxygen was used.

1. MARCO TEORICO

1.1 Respiración anaerobia

La respiración anaerobia es un proceso biológico de oxidorreducción de azúcares y otros compuestos en el que el aceptor terminal de electrones es una molécula distinta del oxígeno, éstos pueden ser:

- Nitrato (NO_3^-)
- Ion férrico (Fe^{3+})
- Sulfato (SO_4^-)
- Dióxido de carbono (CO_2)
- Ciertos compuestos orgánicos (por ejemplo, compuestos halogenados)

En la mayoría de los casos, la fuente de energía usada es un compuesto orgánico, pero también algunos de estos compuestos orgánicos pueden servir como aceptores de electrones. Casi todos los microorganismos que realizan respiración anaerobia son procariotes, y frecuentemente las transformaciones químicas provocadas durante la generación de energía o metabolismo, tienen gran importancia ecológica e industrial.

1.1.1 Digestión anaerobia metanogénica

La digestión anaerobia es un proceso biológico degradativo en el cual parte de los materiales orgánicos de un sustrato son convertidos en biogás (mezcla de dióxido de carbono y metano con trazas de otros elementos), por un consorcio de microorganismos. Dado que el CO_2 , es muy común en la naturaleza, existen varios grupos de procariotes que son capaces de utilizar al CO_2 como aceptor final de electrones durante la respiración anaerobia. Los procariotes reductores del CO_2 más importantes son los metanógenos (productores de metano), un grupo principal del dominio Archaea, compuesto por anaerobios estrictos. Por lo general, el donador de electrones es el H_2 , aunque algunos

otros sustratos, principalmente el acetato, pueden ser convertidos directamente a metano por la acción de los metanógenos. Por lo tanto, para la conversión de la mayoría de los compuestos orgánicos a CH_4 , los metanógenos reciben sustratos necesarios a partir de otros organismos. Esta es la labor de los sintrofos. En la sintrofia dos o más organismos cooperan en la degradación de algunos compuestos. La acción combinada de fermentadores primarios, sintrofos y los consumidores de H_2 hacen prácticamente que cualquier compuesto orgánico puede ser degradado.

En el proceso de digestión anaerobia existe un consorcio de microorganismos que desarrolla un metabolismo coordinado e independiente que le aporta estabilidad al sistema. Actualmente se ha establecido un modelo más completo que consiste en tres fases que ocurren simultáneamente (Figura 1):

- 1) Fase hidrolítica y fermentativa.
- 2) Fase acetogénica y homoacetogénica.
- 3) Fase metanogénica.

En la primera fase (hidrolítica y fermentativa), los polímeros naturales como celulosa, pectina, proteínas, aminoácidos, polisacáridos, compuestos aromáticos, lípidos, etc., son transformados por hidrólisis y fermentación en ácidos carboxílicos (principalmente ácidos grasos volátiles), alcoholes, hidrógeno y dióxido de carbono. En la segunda fase (acetogénica y homoacetogénica), las bacterias acetogénicas transforman los productos finales de la etapa anterior en acetato, hidrógeno y CO_2 , a su vez las bacterias homoacetogénicas utilizan H_2 y CO_2 para la formación de acetato. La función de esta fase es generar sustratos como, hidrógeno, CO_2 y acetato para las bacterias metanogénicas (Veeken y col., 2002). En la última fase, las bacterias metanogénicas producen CH_4 , a partir de H_2 y CO_2 o a partir de acetato, ya que éste participa como fuente de carbono y energía.

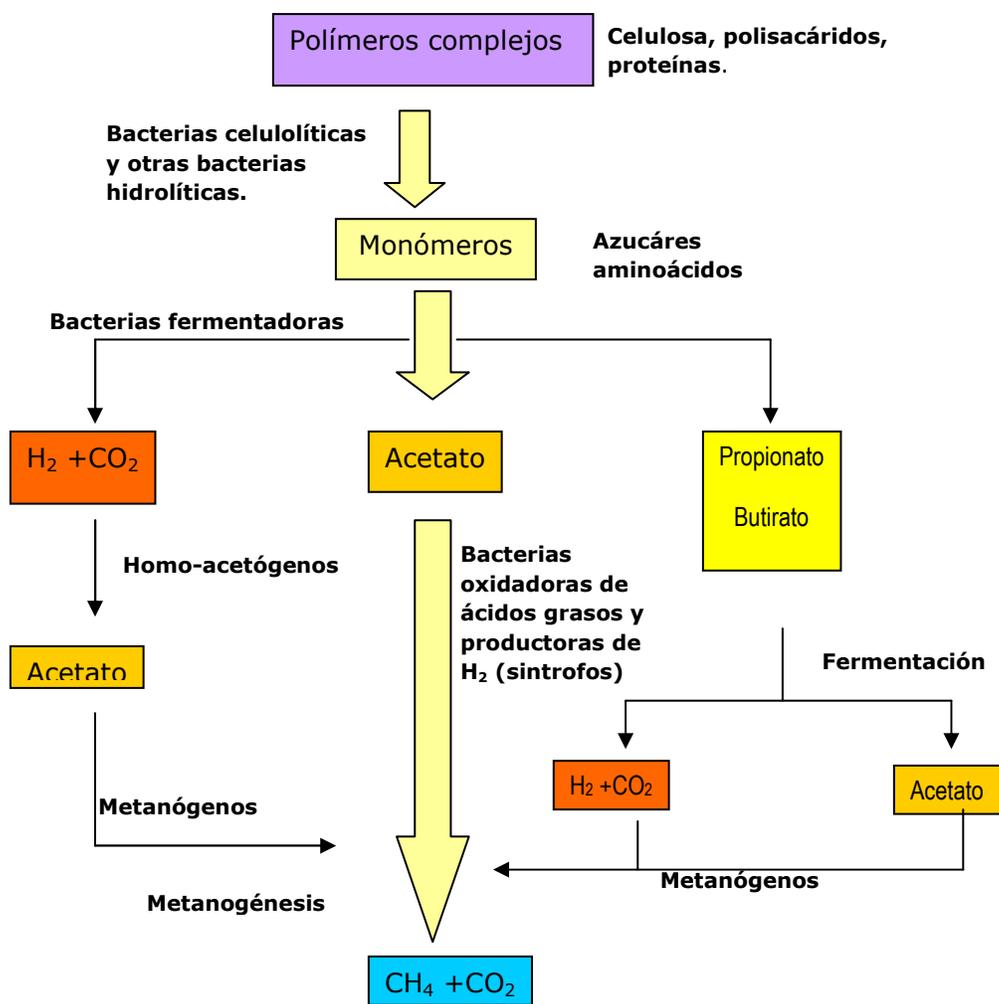


Figura 1. Esquema de la digestión anaerobia. Fuente. Madigan y col. 2004.

La digestión anaerobia puede ser utilizada para la eliminación de una gran variedad de compuestos tóxicos (Krumme y Boyd, 1988, Annachatre y Gheewala, 1996, Mohn y Tiedje, 1992, Fen-xia y Dong, 2004). En esta tesis se utilizó el 2-clorofenol (2-CP) como molécula modelo.

1.2 Distribución de clorofenoles

Los clorofenoles son compuestos orgánicos muy tóxicos y ampliamente distribuidos en el medio ambiente acuático y terrestre. Estos compuestos se encuentran presentes en aguas residuales de industrias químicas (2-180 mg/L), petroquímica (1-400 mg/L),

refinerías (25-50 mg/L), textiles y papeleras (0.03- 600 mg/L), incineración de desechos municipales (Parker y col., 1993), entre otros (Sahinkaya y Dilek., 2006).

Las industrias no son las únicas fuentes de contaminantes dado que los clorofenoles son consumidos en el hogar en forma de insecticidas, fungicidas, desinfectantes y antisépticos contribuyendo relevantemente en la contaminación del medio ambiente (Parker y col., 1993). Por otro lado, la desinfección de agua potable por medio de cloración puede originar la formación de clorofenoles ya que el cloro disuelto en agua reacciona rápidamente con los compuestos fenólicos (fenol, guayacol, catecol) produciendo derivados mono-, di- o triclorados (Knackmuss y Reinike., 1988), reportándose que por este proceso se generan de 0.1-1600 mg/L (WHO, 1993). Se considera que otra forma en que los clorofenoles pueden entrar en el medio ambiente es el resultado de la utilización de contaminantes químicos en forma de conservadores de madera, o por la incineración de desechos municipales (Parker y col., 1993). Concentraciones considerables de 2-clorofenol se forman en el ambiente como resultado de la biodegradación de compuestos policlorados a monoclorados (Annachhatre y Gheewala, 1996).

1.2.1 Propiedades fisicoquímicas del 2-clorofenol (2-CP).

El 2-clorofenol (C_6H_5ClO), es un líquido desde incoloro a ámbar con un olor desagradable, es soluble en alcohol, éter y soluciones alcalinas. Algunas de sus propiedades fisicoquímicas se muestran en la tabla 1. El 2-CP es un compuesto muy soluble en agua (28.5 g/L), por lo que puede migrar fácilmente a medios acuosos y contaminarlos (Smith y col., 1987). Según la constante de Henry ($1.31 \times 10^{-2} \text{ atm} \cdot \text{L/mol}$) y la presión de vapor ($2.9 \times 10^{-3} \text{ atm}$), el compuesto tiene baja volatilidad. De acuerdo al coeficiente de partición octanol-agua (K_{ow} del 2-CP 2.16), que es una medida de cómo una sustancia química puede distribuirse fácilmente en dos solventes inmiscibles, agua (solvente polar) y octanol (solvente relativamente no polar, que representa a las grasas), el 2-CP puede fijarse con firmeza a materia orgánica, sedimento y microorganismos (partes lipofílicas como membranas celulares). Debido a esto y considerando que la vía de exposición al 2-CP puede ser por la cadena alimenticia éste tiende a bioacumularse en la grasa corporal de los animales (Loehr y col., 1988).

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del 2-CP.

Punto de fusión	9.3°C
Punto de ebullición	175°C
Densidad relativa a 25°C	1.26
Coefficiente de partición (Kow)	2.16
Constante de Henry @20°C	1.31 x 10 ⁻² atm L /mol,
pKa a 25°C	8.48
Solubilidad en agua	28.5 g/L
Peso molecular	128.56
Presión de vapor @20°C	2.9 x 10 ⁻³ atm

Fuente. Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals
Index Merk

El 2-clorofenol tiene un pKa de 8.48, por lo que es muy probable que exista como una especie iónica a pH alcalino. Bajo esta condición aumentará su solubilidad en agua y se observará una disminución en su volatilización. Por lo tanto, es recomendable mantener el 2-CP a pH cercanos a su pKa, con el fin de evitar pérdidas del compuesto por volatilización.

1.2.2 Toxicidad del 2-clorofenol

La toxicidad de los clorofenoles para humanos depende del grado de cloración y de la posición de los átomos de cloro. La exposición prolongada a estos compuestos causa irritación en mucosas, produce convulsiones, coma y finalmente la muerte. Se sabe que el 2-CP desencadena una variedad de mecanismos a nivel celular como:

- Daño a la membrana (Bradberry y col. 2004).
- Desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (Narasimhen y col., 1992).
- Disrupción del metabolismo de la Acetil CoA (Bradberry y col. 2004).

Los clorofenoles pueden ser eliminados a través de la orina, aunque los daños fisiológicos no siempre serán reversibles. En microorganismos y organismos inferiores también se han observado efectos biocidas (Davoren y Fogarty, 2005).

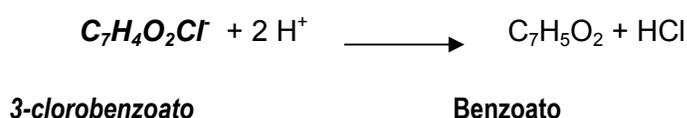
Además el 2-CP es muy tóxico para la vida acuática a concentraciones de 2-7 mg/L (Annachatre y col., 1996). El 2-CP ha sido designado como uno de los contaminantes de alta prioridad por la EPA ya que es muy tóxico, persistente y cancerígeno (ATSDR, 2003).

1.3 Eliminación de clorofenoles

A pesar de que los clorofenoles se caracterizan por ser recalcitrantes, estos pueden ser eliminados por procesos bióticos y abióticos. Un procesos abiótico utilizado es la fotodescomposición, mediante este proceso los clorofenoles experimentan pérdidas y sustituciones de cloro por grupos oxhidrilo, así como la formación y recombinación de radicales. Los productos que se forman dependen de la posición del cloro en el anillo; por ejemplo, para el 2-clorofenol, el principal producto formado es el pirocatecol, y para el 3-clorofenol se genera básicamente resorcinol (Miller y col., 1988). Aún cuando la velocidad de hidrólisis fotolítica para monoclorofenoles y 2,4-diclorofenol puede ser significativa a longitudes de onda menores que 280 nm y en condiciones alcalinas, ésta es muy baja cuando se tiene irradiación solar (>280 nm) y pH casi neutro. Además, la luz solar es altamente atenuada en el agua porque es absorbida por la materia suspendida u otros compuestos presentes en el agua, así que la hidrólisis del 2-CP por la luz solar no presenta un efecto significativo (Miller y col., 1988). Otro método utilizado es la volatilización (Gantzer y col., 1991), sin embargo, los procesos abióticos ocasionan contaminación colateral durante su aplicación. Por esta razón los tratamientos biológicos son una alternativa recomendable. Los procesos biológicos que se pueden utilizar para la eliminación de 2-CP son la respiración anaerobia, respiración aerobia o la combinación de ambas.

1.3.1 Decloración reductiva

Algunos compuestos clorados funcionan como aceptores de electrones durante la respiración anaerobia en el proceso conocido como decloración o deshalogenación reductiva que es la sustitución de un halógeno (en este caso el cloro) de una molécula por medio de la adición de electrones (provenientes de un donador) a dicha molécula (Mohn y col., 1992). Aunque los compuestos clorados son tóxicos, generalmente los productos de la decloración son menos tóxicos o carecen de toxicidad. Por ejemplo *Desulfomonile* crece de forma anaerobia con H₂ o compuestos orgánicos como donadores de electrones y el clorobenzoato es el aceptor:



Hay una amplia variedad de bacterias que pueden llevar a cabo la decloración reductora (Mogensen y col. 2003) ver tabla 2.

Tabla 2. Aceptores de electrones para diferentes microorganismos anaerobios.

Microorganismo	Aceptor de electrones
<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	2,4-DCP
<i>Desulfitobacterium strain PCE1</i>	2-CP, 2,4,6-TCP
<i>Desulfitobacterium afinense</i>	2,4 DCP, 3,5-DCP
<i>Desulfitobacterium chlororespirans</i>	2,3-DCP
<i>Desulfitobacterium tiedjei strain DCB-1</i>	Capaz de la dehalogenacion
<i>Desulfitobacterium Frappiere</i>	Capaz de la dehalogenacion
Strain 2 CP-1	2-CP

Fuente. Mogensen y col. 2003

En la digestión anaerobia se utiliza la dechloración reductora como paso inicial para el consumo de compuestos aromáticos, entre ellos el 2-clorofenol (Mohn y Tiedje, 1992). Posterior a la dechloración ocurren una serie de reacciones posteriores reacciones que las llevan hasta la producción de dióxido de carbono y metano.

Diversos autores han estudiado la biodegradabilidad de clorofenoles en digestión anaerobia. Por ejemplo, Basu y col. (1996) trabajaron con 50 mg de 2-CP/L en un cultivo en lote con lodos anaerobios adaptados por 4 meses al 2-CP, utilizándolo como aceptor de electrones y probaron donadores de electrones orgánicos (extracto de levadura, acetato, propionato) en diferentes atmosferas (N_2/CO_2 y H_2/CO_2). Encontraron que las mejores velocidades de consumo del 2-CP fueron con extracto de levadura 4.1 mg 2-CP/L*d (0.0034 mg 2-CP/g SSV*d) y en una atmosfera de N_2/CO_2 de 3.084 mg 2-CP/L*d (0.0025 mg 2-CP/g SSV*d). Identificaron intermediarios como fenol y benzoato, lo que mostró que el primer paso en la eliminación del 2-CP es la transformación a fenol por dechloración reductiva. Estos autores enfocaron sus estudios a encontrar las mejores condiciones para llevar a cabo la dechloración, sin embargo, no evaluaron la producción de metano y dióxido de carbono como indicadores de la mineralización del 2-CP.

En 1985, Mikesell y Boyd utilizaron diversos clorofenoles como aceptores de electrones entre ellos penta, tetra, tri, di y monoclorados. Utilizaron cultivos en lote con una atmósfera de N_2/CO_2 (80/20). En este estudio se determinaron las velocidades de consumo de los clorofenoles (Tabla 3). Además, determinaron los intermediarios de las rutas de degradación del penta y tetraclorofenol. Reportaron que la dechloración reductora es el primer paso en la eliminación del 2-CP, observando que primeramente se da la remoción de los átomos de la posición orto, seguidos *meta* y por último, la posición *para*.

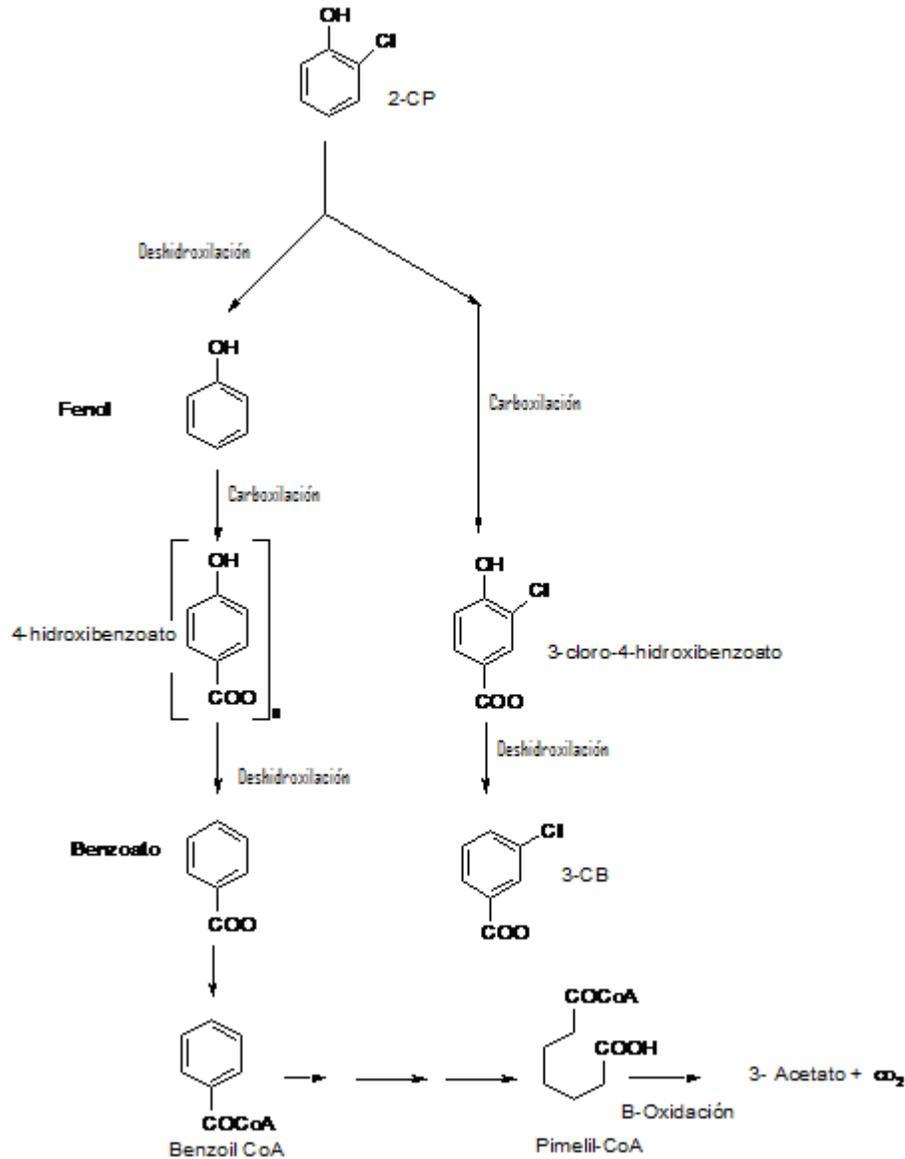
Tabla 3. Velocidades de consumo de clorofenoles en condiciones anaerobias.

Componente	Concentración inicial (mg/L)	Velocidad de desaparición
2,4,5-TCP	12.38	1.76 mg/L*d
2,4-DCP	12.25	1.75 mg/L*d
PCP	12.5	0.89 mg/L*d
2-CP	20.4	1.45 mg/L*d
3-CP	17.06	0.31 mg/L*d
4-CP	23	0.16 mg/L*d

Mikesell y Boyd (1985).

Los resultados obtenidos mostraron que las velocidades de consumo de los clorofenoles dependen de la posición y del número de átomos de cloro que se tiene en el anillo. Por otra parte, en este estudio obtuvieron una velocidad de desaparición del 2-clorofenol menor que en el trabajo de Basu y col. (1996), aún cuando la concentración del compuesto fue menor, esto se pudo deber a que el inóculo utilizado no fue adaptado previamente.

En 1999, Becker y col., trabajaron con un consorcio anaerobio, utilizando una concentración de 25 mg/L de 2-clorofenol como aceptor de electrones en una atmósfera de $N_2/CO_2/H_2$ (85/10/5). A partir de estos resultados dilucidaron la posible ruta de mineralización del 2-CP (Figura 2), como se observa, el fenol fue el primer intermediario y sugieren que este fue producido por la dechloración reductora del 2-CP, como segundo intermediario obtuvieron al benzoato y proponen que probablemente surge vía carboxilación o deshidroxilación del fenol, sin embargo, sugieren una ruta alterna que sucede al adicionar fenol y peptona de proteasa al 2-CP, en este caso se produce 3-Clorobenzoato (3-CB) que es un compuesto recalcitrante y que probablemente es consecuencia de la deshidroxilación del 2-CP.



Fuente Becker y col. 1999

Fig 2. Posibles rutas de biotransformación del 2-CP en un lodo anaerobio.

Hagglblom y col. (1993) evaluaron la biodegradación anaerobia en lote de 13 mg/L de 2CP, 3CP y 4CP con lodos adaptados, acoplado con diferentes aceptores de electrones como nitrato, sulfato y carbonato. El 2-CP fue consumido bajo las tres condiciones, sin embargo el tiempo de desaparición del 2-CP fue diferente en cada caso requiriendo 106, 92 y menos de 30 días, respectivamente. La velocidad de consumo fue de 4.1 mg/L·d

bajo condiciones metanogénicas y de 1.07 mg/L-d en sulfatorreducción. También encontraron al fenol como intermediario.

Además, realizaron la estequiometría de la reacción para comprobar la mineralización del 2-CP a CH₄ y CO₂. Este es el único estudio de los antes mencionados en los que se cuantifica la producción de metano y se realizan balances de masa para comprobar la mineralización del 2-CP, obteniendo la recuperación de 234±28 μmol de CH₄ que equivalen a 72 ±14 μmol (10 mg/L) de 2-CP consumido.

Fen-xia Ye y Dong-sheng (2004) realizaron cinéticas de degradación de monoclorofenoles en lote para evaluar el efecto de la aclimatación en lodos metanogénicos. Encontraron que en lodos sin contacto previo al 2-CP el consumo de 30 mg 2-CP/L inicio después de una fase de retardo de 15 días. Mientras que en lodos con previo contacto con 2-CP de 65 días, y suplementados con glucosa y 30 mg 2-CP/L, la fase de retardo se redujo a 7 días. Mencionan que después de un periodo de contacto de 65 y 100 días la velocidad de consumo se incremento de 0.25 mg 2-CP/g SSV*d a 0.38 mg 2CP/g SSV*d respectivamente. Lo anterior aporta bases sobre la importancia de la aclimatación para mejorar la velocidad de consumo de clorofenoles.

Hay evidencias que indican que en comunidades anaerobias algunos aceptores de electrones afectan la actividad de deshalogenación. Por ejemplo, el sulfato, un aceptor de electrones utilizado en la sulfatorreducción, puede inhibir la deshalogenación reductiva. Al respecto Suflita y col. (1987) trabajaron con dos poblaciones microbianas, metanogénica y sulfatorreductora, encontrando que solo la metanogénica mostró la habilidad para deshalogenar y mineralizar cloroanilinas, clorobenzoatos, clorofenoles y clorofenoxiacetatos. El potencial para deshalogenar el 2,4,5-triclorofenoxiacetato existió en ambas poblaciones, pero al parecer la adición de sulfato inhibe la dehalogenación en la población sulfatorreductora. Asimismo Kohring y col. (1989) reportó que la adición de nitrato inhibe la decloración del 2,4-diclorofenol, el sulfato aumenta el tiempo de adaptación y disminuye la decloración en la posición orto de la molécula. Sin embargo, esto no es en todos los casos. Sharak y col. (1989) probaron el efecto de sulfato y nitrato durante la degradación por digestión anaerobia de monoclorobenzoatos y

monoclorofenoles. El sulfato y nitrato agregados inhibieron la dechloración de monoclorofenoles incluyendo al 2-clorofenol, sin embargo hubo excepciones. Para la deshalogenación del 3-clorobenzoato se requiere de nitrato y la dechloración del 4-clorofenol se estimuló al adicionar sulfato.

La evidencia disponible sugiere que el nitrato, y sulfato en algunos casos puede inhibir la dehalogenación en cultivos anaerobios y que esta varía dependiendo de la naturaleza del compuesto (posición y número de sustituyentes), condiciones químicas y biológicas. Otro factor importante es la composición química del cultivo, ya que puede haber poblaciones capaces de utilizar aceptores de electrones como nitrato y sulfato, que serían capaces de competir con las deshalogenantes por los electrones proporcionados por los donadores y necesarios para la deshalogenación, probablemente ésta sea una de las explicaciones para la total o parcial inhibición de la dechloración reductiva (Mohn y Tiedje, 1992). Debido a que otros aceptores de electrones pueden afectar la dechloración reductiva, es necesario poner atención con éstos en los tratamientos de agua que contengan.

1.3.2 Respiración aerobia

La respiración aerobia es el proceso por el cual un compuesto se oxida usando oxígeno como aceptor final de electrones (Madigan y col., 2004). Se ha descubierto que hay microorganismos aerobios capaces de eliminar compuestos clorados (Fava y col., 1995). Para la eliminación de clorofenoles vía aerobia es necesario como primer paso la oxidación del compuesto para la formación de clorocatecoles correspondientes (Mars y col., 1997). Posteriormente se debe de romper el anillo aromático con el átomo de cloro integrado (Haggblom, 1990). El 2-CP y 3-CP tienen como primer metabolito al 3-clorocatecol, mientras que el 4-clorofenol es transformado a 4-clorocatecol (Farrel y Brid., 2000, Haggblom, 1990) ver figura. 3. Los clorocatecoles son el metabolito central de la respiración aerobia de los compuestos cloroaromáticos, seguido de éste viene el rompimiento del anillo por dioxidasas (Farrel y col., 2000).

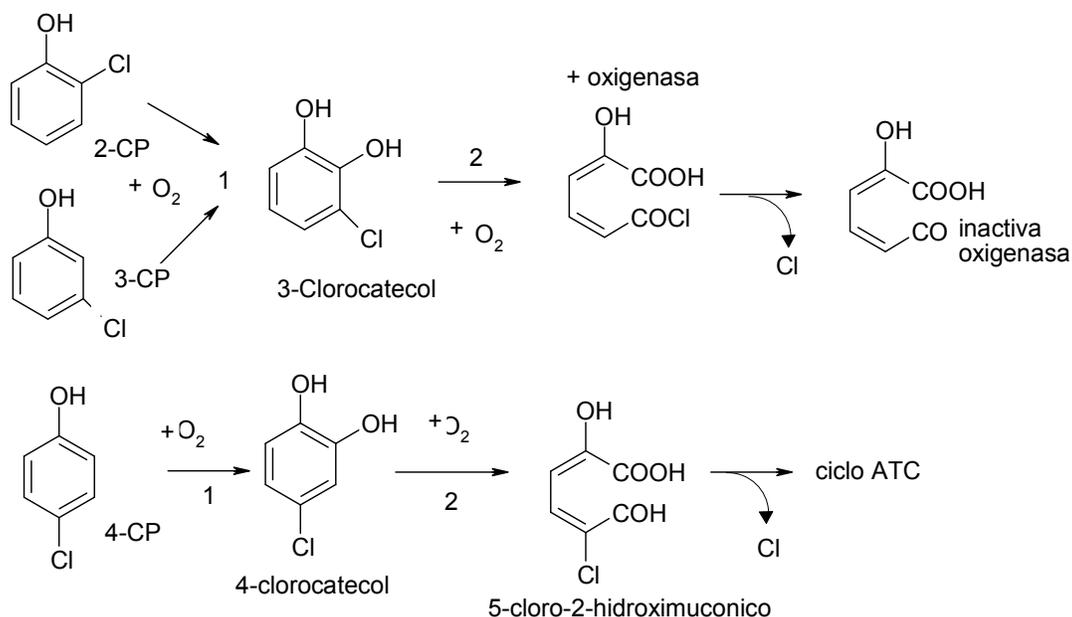


Fig 3. Ruta de degradación aerobia.

Fuente Weiser y col.(1994)

(1) Fenol hidroxilasa, (2) Catecol 2,3-dioxigenasa

En la degradación de 2-CP y 3-CP vía 3-clorocatecol se ha sugerido que sigue como ruta el rompimiento *meta*. En éste se utiliza la **enzima catecol 2,3-dioxigenasa** (Mars y col., 1997). Se ha encontrado que generalmente el rompimiento *meta* del 3-clorocatecol da como resultado la inactivación de esta enzima, por lo que el 3-clorocatecol queda acumulado (Schmidt y col., 1983).

Weiser y col. (1994) mencionan que la oxidación del 4-CP, tiene como resultado la producción de 5-cloro-2-hidroxiimucónico semialdehído, que es posteriormente oxidado por el ciclo de los ácidos tricarboxílicos a dióxido de carbono (Figura 3). Con base en lo anterior se puede decir que el tratamiento aerobio del 2-clorofenol no es buena opción para mineralizarlo ya que se tiene inactiva la dioxigenasa y el 2-CP se transforma a un intermediario que se acumula. Esto queda evidenciado en un estudio realizado en el 2000 por Farrel y Quilty, quienes utilizaron cultivos en lote bajo condiciones aerobias para la degradación de 200 mg/L de 2-CP y 3-CP. Durante la eliminación del 2-CP y 3-CP

detectaron la inactivación de la catecol 2,3-dioxigenasa (ver figura 3.). La degradación fue incompleta teniendo una eficiencia de eliminación para el 2-CP del 68.4% y una eficiencia de eliminación de Cl⁻ del 30.2%. Con respecto al 3-CP obtuvieron una eficiencia de eliminación del 100%, eficiencia de eliminación de Cl⁻ del 38%. Por otra parte observaron una acumulación de los intermediarios de la ruta del 2-CP y 3-CP entre los que se encuentra el 3-Clorocatecol.

Sahinkaya y Dilek (2006) evaluaron el consumo de 2.3 g 4-CP/L y 1.2 g 2,4-DCP/L utilizando lodos aclimatados por 260 días en un reactor de contacto rotatorio (RBC), obteniendo eficiencias de remoción de 96% y 97% respectivamente. Cabe mencionar que el tratamiento del 4-clorofenol se puede hacer vía aerobia ya que no hay inhibición de la ruta metabólica. Sin embargo, no identificaron los intermediarios, producción de dióxido de carbono o producción de biomasa como evidencia de la mineralización.

Hasta ahora se han considerado dos tipos de respiración para la eliminación de clorofenoles, la aerobia en donde solo se da la transformación del 2-CP hasta algún intermediario y la anaerobia en la que se lleva a cabo la dechloración reductora y la posterior formación de productos que pueden ser metabolizados por bacterias aerobias o anaerobias (Atuanya, 2000), por lo que teóricamente los sistemas secuenciales anaerobio/aerobio pueden ser una alternativa para la eliminación de compuestos aromáticos clorados.

1.3.3 Sistemas anaerobio/aerobio

Utilizar ambos procesos respiratorios (anaerobio-aerobio) puede ser una opción aplicable para la mineralización de clorofenoles. Al respecto, Atuanya y col. (2000) realizaron un estudio en el que evaluaron el desempeño de dos reactores; un UASB (anaerobic sludge blanked) y ASG (aerobic suspended growth) (anaerobio/aerobio) en serie y paralelo para la degradación de clorofenoles. Utilizaron 100 mg/L de 2,4-DCP como aceptor de electrones y 350 mg/L de glucosa como donador de electrones, las condiciones a las que fueron operados fueron TRH 13.2 y 26.2 h y velocidades de carga orgánica de clorofenoles de 0.09 y 0.18 kg/m³-d. Mencionan que los mejores porcentajes de remoción del 2,4 DCP se obtuvieron cuando utilizaron el mayor TRH y la mayor carga orgánica. Cuando solo se utiliza el reactor UASB la eficiencia de remoción de 2,4 DCP es de 52 % y en el caso del reactor ASG 78 %. Cuando los reactores son operados en serie se tiene un 86 % de remoción del 2,4-DCP. Con base en estos resultados se puede considerar que el tratamiento en serie (combinación de los dos tratamientos) es una mejor opción para la eliminación del 2,4-CP, debido a que el tratamiento anaerobio lleva a cabo la dechloración reductora, y los productos de esta pueden ser utilizados como sustratos en el tratamiento aerobio y así lograr su mineralización.

En el 2007, Majumder y Gupta trabajaron con la combinación de un reactor UASB (anaerobio) y RBC (aerobio) para el tratamiento de 30 mg 2CP/L y 30 mg 2,4DCP/L. Durante un primer periodo de aclimatación de 190 días aumentan la concentración de compuestos gradualmente hasta alcanzar 30 mg/L en ambos casos. En el caso del 2-CP se observó una eficiencia de remoción del 100 % en el reactor UASB (TRH 16 h) por lo tanto en este ocurre una completa dechloración. El reactor RBC (TRH 37.7 h) fue alimentado con los productos de la dechloración, y sólo se cuantificó la producción de dióxido de carbono como evidencia de la mineralización sin realizar un balance de materiales. Con estos resultados se muestra la viabilidad de utilizar un sistema anaerobio-aerobio para mineralizar el 2-CP.

La característica general de la mayoría de estos estudios es que no toman en cuenta la volatilización de los compuestos, además, no evalúan cualitativamente y cuantitativamente los intermediarios y los productos finales. Utilizar reactores parcialmente aireados para la mineralización de clorofenoles resulta interesante, sin embargo, para que el proceso se lleve a cabo es necesario que los microorganismos involucrados cuenten con mecanismos para tolerar el oxígeno.

1.3.4 Efecto del oxígeno en cultivos anaerobios

El oxígeno puede ser un compuesto tóxico, sobre todo para los microorganismos que son acetogénicos y metanogénicos, que son normalmente considerados como anaerobios estrictos (Hungate, 1969; Whitman y col., 1992). Las bacterias anaerobias estrictas, son microorganismos incapaces de oxidar el carbono orgánico a dióxido de carbono y agua y de utilizar el oxígeno en la cadena respiratoria como el aceptor final de electrones. El oxígeno es un reactivo poderoso que genera radicales potencialmente tóxicos para las células, sobre todo, el peróxido de hidrógeno y superóxido (Pfenning, 1978.; Morris, 1979.; Gottschalk y Peinemann, 1992). El efecto tóxico puede dañar el ADN cromosómico.

Las bacterias aerobias y facultativas poseen mecanismos apropiados para protegerse del oxígeno. Es un hecho que la protección es por la presencia de dos enzimas, la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (Morris, 1979; Gottschalk y Peinemann, 1992; Fee, 1992).

Se ha sugerido la falta total de SOD como la razón para la intolerancia del oxígeno de las bacterias anaerobias estrictas (Morris, 1979), aunque hay algunas bacterias anaerobias estrictas que pueden contener SOD, razón por la cual pueden tolerar niveles bajos de oxígeno (Rolfe y col., 1978; Morris, 1979). En lodos anaerobios granulares, un factor importante para la tolerancia a la exposición de O₂ de bacterias metanogénicas y acetogénicas es la presencia de bacterias facultativas en los mismos. La presencia de metanogénicas y facultativas puede dar como resultado la existencia de bicapas (Kato y col. 1997). Como se observa en la figura 4, en las bicapas, los microorganismos anaerobios estrictos como las metanogénicas, se encuentran en el centro mientras que las facultativas están localizadas en la periferia, esto permite que la difusión y consumo del oxígeno se de en su mayoría en la parte de las facultativas y aerobias, que lo utilizan para su metabolismo (Wijkieks et al., 1991).

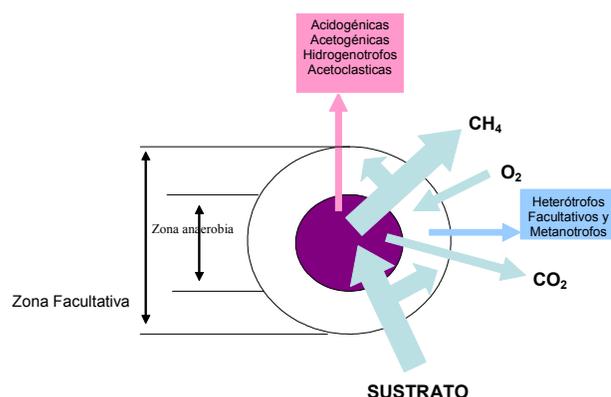


Fig 4. Bicapa formada en un lodo granular. Kato y col. (1997)

En lodos de reactores UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket), las bacterias aerobias y facultativas utilizan el oxígeno presente en las aguas residuales, creando condiciones de anaerobiosis que favorecen la actividad de las bacterias metanogénicas. Con lo anterior se puede explicar cómo las bacterias metanogénicas pueden estar presentes y realizar su metabolismo en presencia de oxígeno.

Garibay y col. (2005) en un reactor de lecho fluidizado parcialmente aireado con cargas de aire 0.001 vvm, 0.01vvm y un control metanogénico para la remoción de una mezcla de 80 mg/L·d de triclorofenol (TCP) y 20 mg/L·d fenol, con una carga de 1 g DQO-sacarosa/L·d como donador de electrones, con una trampa de carbón activado para determinar la volatilización, utilizando un reactor metanogénico como control. Algunos de los resultados que observaron fue que la eficiencia de remoción del TCP y fenol para los tres casos fue del 100%. La producción de metano fue afectada negativamente ya que en el reactor control obtuvieron 0.29 ± 0.10 L/LFB*d y a una carga de 0.001 y 0.01 vvm alcanzaron 0.04 ± 0.02 y 0.02 ± 0.01 L/LFB*d respectivamente. Con estos resultados se puede decir que aunque la actividad metanogénica decrezca significativamente puede ocurrir en condiciones parcialmente aireadas. De esta manera se estaría produciendo menos metano y mas dióxido de carbono que en términos de contaminación es más recomendable. En este estudio no dan una explicación del papel que juega el oxígeno en la eliminación del TCP.

Como se ha mencionado anteriormente, la utilización de sistemas anaerobio-aerobio son una buena alternativa para el tratamiento de clorofenoles, este se puede lograr aireando parcialmente los cultivos anaerobios. En este proyecto se pretende utilizar un cultivo metanogénico y adicionar bajas concentraciones de oxígeno para mineralizar el 2-CP. Se pretende cuidar aspectos como la medición de oxígeno, la producción de metano e intermediarios, ya que en muchos casos solo evalúan la desaparición de clorofenoles sin analizar intermediarios o producción de biogás, así como tratar de explicar el papel del oxígeno en la eliminación de este tipo de compuestos.

2. JUSTIFICACIÓN

Entre los compuestos con más alta toxicidad presentes en el medio ambiente se encuentra el 2-clorofenol. La mineralización del 2-clorofenol mediante metanogénesis no está completamente evidenciada, ya que en algunas investigaciones sólo se mide su desaparición y la formación de algunos intermediarios como fenol, benzoato y no se cuantifica la producción de metano.

No existen estudios sobre la mineralización del 2-Clorofenol en condiciones anaerobias parcialmente aireadas. Sin embargo, se ha encontrado que para otros clorofenoles se mejora la velocidad de consumo, aunque el papel que juega el oxígeno en estos cultivos no está claro.

3. OBJETIVO

Estudiar en cultivos en lote, el efecto de diferentes donadores de electrones y del oxígeno en la metanogénesis del 2-CP a través de la eficiencia de consumo de sustrato, rendimiento y velocidades específicas.

3.1 Objetivos particulares

Evaluar:

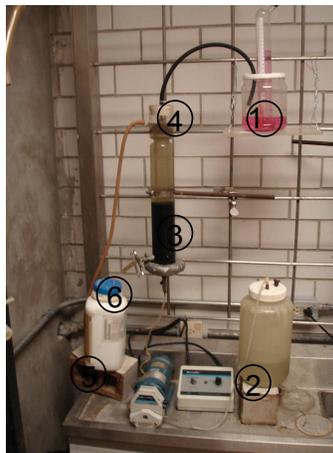
- El efecto de diferentes concentraciones de 2-CP sobre lodos metanogénicos en condiciones anaerobias.
- El efecto de diferentes donadores de electrones sobre la mineralización a una concentración constante de 2-CP, bajo condiciones anaerobias.
- El periodo de aclimatación de los lodos al 2-CP sobre la velocidad de mineralización de este compuesto.
- El efecto de diferentes concentraciones de oxígeno sobre la mineralización del 2-CP

4.MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Reactor metanogénico UASB y fuente de inóculo

Se instaló un reactor UASB, elaborado de vidrio con un volumen de operación de 1420 mL (figura 5). El reactor fue alimentado en continuo por medio de una bomba peristáltica con manguera de silicón. El biogás generado por el reactor fue separado por una campana de liquido-biogás-biomasa recolectado y llevado por medio de una manguera de silicón para su cuantificación a una columna de desplazamiento que contenía una solución de 300 mg de NaCl/L con un pH de 2 y con rojo de metilo como indicador. Previo a su operación en continuo el reactor fue alimentado en lote con acetato (1 g/L) por dos meses como fuente de carbono y medio mineral Visser modificado (Visser y col., 1995). Las condiciones de operación del reactor en continuo fueron: TRH 2 días, temperatura de $32\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, flujo de alimentación 0.49 mL/min y una velocidad de carga de 146 mg de C/L·d (380 mg acetato/L·d). El reactor se inoculó con un lodo granular proveniente de una planta de tratamiento de agua residual de una industria cervecera (Central de Malta) en el estado de Puebla el cual contenía 17.52 g SSV/L. Después que los lodos alcanzaron el estado estacionario metanogénico, estos fueron utilizados como inóculo para los ensayos cinéticos en lote.



1. Columna de desplazamiento
2. Influyente
3. Lodo granular
4. Campana de separación
5. Efluente
6. Puerto de muestreo de lodo

Figura 5. Reactor UASB.

4.1.2 Medio de cultivo

El medio de cultivo que se utilizó para la alimentación del reactor UASB, fue el medio Visser modificado. La modificación consistió en que el medio no contenía extracto de levadura y a la adición de calcio en una concentración de 100 mg/L, para favorecer la granulación en lodos anaerobios (Yu y col., 2001). Como fuente de carbono y energía se utilizó acetato de sodio (1g/L). En las tablas 4 y 5 se muestra la formulación del medio de cultivo.

Tabla 4. Medio mineral Visser.

Componente	g/L
NaH ₂ PO ₄	0.703
NH ₄ Cl	0.028
MgSO ₄	0.111
CaCl ₂	0.1
NaCl	0.297
KCl	0.5
Elem. traza (mL)	1

Tabla 5. Elementos traza

Componente	g/L
FeCl ₂ 4H ₂ O	2
MnCl ₂ 4H ₂ O	0.786
Na ₂ SeO ₃	0.1
H ₃ BO ₃	0.05
ZnCl ₂	0.05
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.05
AlCl ₃	0.05
NiCl ₂ 6H ₂ O	0.05
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.07
CuCl ₂ 2H ₂ O	0.05
HCl (Concentrado)	0.05 (mL)

4.1.3 Cinéticas anaerobias

Las cinéticas en lote se realizaron en botellas serológicas de 60 mL, que contenían 35.5 mL de medio mineral Visser, 4.5 mL de inóculo y 20 mL de espacio de cabeza, se variaron algunas condiciones como concentraciones de 2-CP, atmósferas, donadores de electrones, presencia de oxígeno. Los experimentos fueron diseñados de manera que cada botella sólo correspondiera a una muestra. Todas las botellas fueron incubadas a

35°C y de cada una se determinó la producción de biogás, la concentración de 2-clorofenol e intermediarios así como el carbono total presente en el medio de cultivo.

4.1.3.1 Pruebas abióticas de volatilidad y adsorción con el 2-CP

Las pruebas abióticas se realizaron con el fin de identificar la presencia de interacciones químicas entre los componentes del medio de cultivo y el 2-clorofenol, fenómenos de volatilización y de adsorción en los lodos granulares. Ambas pruebas se hicieron por triplicado a tres diferentes concentraciones 10, 50, 100 mg 2-CP/L y con atmósfera de nitrógeno. La prueba de volatilidad se realizó en ausencia de inóculo, bajo las condiciones antes mencionadas. La prueba de adsorción se realizó en presencia de inóculo inactivo (esterilizado a 15 lb/plg² por 3 horas).

4.1.3.2 Actividad metanogénica

La actividad metanogénica está definida como la velocidad de producción de metano con respecto al tiempo y al contenido de sólidos suspendidos volátiles expresada en mg DQO-CH₄ mg SSV⁻¹ d⁻¹. La prueba de actividad se realizó con dos sustratos independientes como fuente de carbono (glucosa y acetato), a una concentración de 2 gDQO/L cada uno y medio mineral Visser. La prueba se realizó con inóculo proveniente del reactor, por duplicado y como controles se utilizaron botellas y medio mineral sin fuente de carbono (Tabla 6).

Tabla 6. Diseño experimental para la prueba de actividad metanogénica.

Fuente de Carbono	DQO _T (g/L)	Relación másica g DQO/g SSV	Medio mineral (mL)	Inóculo (mL)
Glucosa	2	0.5	30.7	9.3
Acetato	2	0.5	30.7	9.3
Control	0	0	30.7	9.3

Se cuantificó la producción de biogás durante 24 h, por medio del volumen desplazado en tubos de solución salina (pH 2) y DQO.

4.1.3.3 Pruebas para la elección de la concentración de trabajo de 2-CP

Con la finalidad de evaluar el efecto de la concentración de 2-CP sobre los lodos anaerobios, se realizaron pruebas en lote probando tres concentraciones de 10, 50 y 500 mg/L de 2-CP en presencia y ausencia de acetato (donador de electrones), en relación estequiométrica con el 2-CP, en atmósfera de nitrógeno. En la tabla 7 se muestra el diseño experimental de las cinéticas de 2 CP.

Tabla 7. Diseño de las cinéticas de 2 clorofenol a 10, 50 y 500 mg/L.

Muestra	Acetato (mg/L)	Carbono de Acetato (mg/L)	2-CP (mg/L)	Carbono de 2-CP (mg/L)
Control	0	0	0	0
1	5.9	2.36	10	5.6
2	29.6	11.84	50	28
3	296	118.4	500	280
4	0	0	10	10
5	0	0	50	50
6	0	0	500	500

4.1.3.4 Prueba con diferentes donadores de electrones y atmósferas en la mineralización del 2-clorofenol

Se realizaron cinéticas en lote para evaluar el efecto de diferentes dos donadores de electrones orgánicos (acetato, fenol) sobre la mineralización de 50 mg 2CP/L, utilizando tres atmósferas (N₂, CO₂ y He). En la Tabla 8 se muestra el diseño experimental de estas pruebas. Se evaluaron la velocidad de consumo, eficiencia de consumo y rendimiento de producción de biogás a partir del carbono consumido.

Tabla 8. Diseño de la cinética de 2-CP, para evaluar el efecto de diferentes donadores.

Muestra	2-CP (mg/L)	Carbono 2-CP mg C/L	Donador de electrones (mg C/L)	Atmósfera
Control	0	0	0	Nitrógeno
Control	0	0	0	Helio
Control	0	0	0	Dióxido
1	50	28	0	Nitrógeno
2	50	28	11.8 ^a	Nitrógeno
4	50	28	0	Dióxido
5	50	28	0	Helio
6	50	28	35 ^b	Helio

^a Acetato ^b Fenol

4.1.3.5 Prueba de mineralización del 2-CP en 50 y 80 días de aclimatación al compuesto

Con los lodos utilizados en las pruebas anteriores, se realizó una cinética en lote para evaluar el efecto del tiempo de aclimatación (50 días) sobre la mineralización de 2-CP, utilizando una concentración de 50 mg/L, en presencia y ausencia de acetato en relación estequiométrica como donador orgánico de electrones y una atmósfera de nitrógeno. La tabla 9 muestra el diseño experimental de estas pruebas.

Tabla 9. Diseño de las cinéticas de 2 clorofenol, para evaluar el efecto de la aclimatación.

Muestra	2-CP (mg/L)	Carbono de 2-CP (mg/L)	Acetato (mg/L)	Carbono de acetato (mg/L)
Control	0	0	0	0
1	50	28	29.6	11.8
2	50	28	0	0

Con los lodos utilizados en la cinética anterior se realizó una prueba en lote para evaluar el efecto de un tercer periodo de aclimatación (80 días) sobre la mineralización de 2-CP, utilizando una concentración de 50 mg 2-CP/L (28 mg C/L) y una atmósfera de nitrógeno, en este caso no se utilizó acetato dado que en pruebas anteriores se observó que este se consumía de forma independiente.

4.1.4 Cinéticas con oxígeno

4.1.4.1 Cinética de mineralización del 2-clorofenol en presencia de oxígeno

Para evaluar el efecto del oxígeno sobre la mineralización de 2-CP se realizaron cinéticas utilizando una concentración de 50 mg 2-CP/L y se probaron 4 concentraciones de oxígeno (0.5, 1, 1.5, 2 mg/L) utilizando las mismas condiciones que las cinéticas anaerobias. En la tabla 10 se muestra el diseño experimental de estas cinéticas.

Tabla 10. Diseño de las cinéticas de mineralización del 2-CP en presencia de oxígeno.

Muestra	2-CP (mg/L)	Carbono de 2-CP (mg C/L)	Oxígeno (mg/L)
Control	0	0	0
1	50	28	0
2	50	28	0.5
3	50	28	1
4	50	28	1.5
5	50	28	2

Una vez finalizada estas cinéticas se volvieron a adicionar 50 mg 2CP/L a cada una de las botellas para evaluar el efecto de la adaptación al 2-CP y al oxígeno del inóculo siguiendo el mismo diseño experimental de la tabla 10.

4.2 Métodos analíticos

En la tabla 11 se muestran los métodos analíticos utilizados en el trabajo experimental.

Tabla 11. Métodos analíticos

Análisis	Método
2-CP, fenol y benzoato	Cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC)
Biogás	Cromatografía de gases detector de conductividad térmica CG-TCD
Carbono orgánico total	Analizador de carbono orgánico total TOC
Acetato	Cromatografía de gases detector de ionizador de flama CG-FID
DQO y SSV	APHA, 1995

De cada uno de los métodos analíticos se hicieron al menos tres curvas de calibración, se obtuvieron los coeficientes de variación, correlación y se determinaron los parámetros de la ecuación de la recta, para todos los casos el coeficiente de variación fue menor al 15 %, lo que indica que todos los métodos fueron reproducibles. En la tabla 12, se presentan los valores de las pendientes así como los coeficientes de correlación.

Tabla 12. Promedios de pendientes de la recta y coeficientes de correlación de los métodos analíticos

Análisis	Concentración (mg/L)	Pendiente	Coef. Correlación
2-CP	0-100	18481± 1295	0.9927±0.08
Fenol	0-100	14015±1154	0.9999±0.001
Benzoato	0-100	13543±1043	0.9843±0.06
Metano	0-50	352.58±23	0.9974±0.003
Dióxido de carbono	0-50	111.59±14	0.9899±0.007
Carbono total	0-100	257.05±24	0.9943±0.005
Carbono inorgánico	0-100	340.26±78	0.9888±0.009
Acetato	0-100	149.53±42	0.9845±0.08
DQO	0-1600	0.0005±0.0001	0.9925±0.001

4.2.1 Cuantificación de 2-clorofenol, fenol y benzoato.

La identificación 2-CP e intermediarios se realizó mediante una sola inyección por cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC) utilizando un detector de arreglo de diodos, las condiciones de operación del cromatografo fueron las siguientes:

- Fase móvil: acetonitrilo, agua (50:50)
- Columna C18 5 μ , 250 mm X 4.6 mm
- λ : 280 nm
- Flujo: 1 mL/min
- T: 20°C

Se prepararon estándares de 2-clorofenol, fenol y benzoato. Se elaboraron a partir de estas se realizaron diferentes diluciones de soluciones madre de 1000 mg/L de fenol y 1000 mg/L de benzoato. El volumen de inyección fue de 20 μ L de la muestra filtrada con membrana de nitrocelulosa de 0.22 μ m GSWP y 13 mm de diámetro. Cada concentración se midió por triplicado. La figura 6, muestra las curvas resultantes del método analítico. A partir de los parámetros obtenidos en las curvas se determinaron las concentraciones no conocidas de 2-clorofenol, fenol y benzoato de cada una de las muestras.

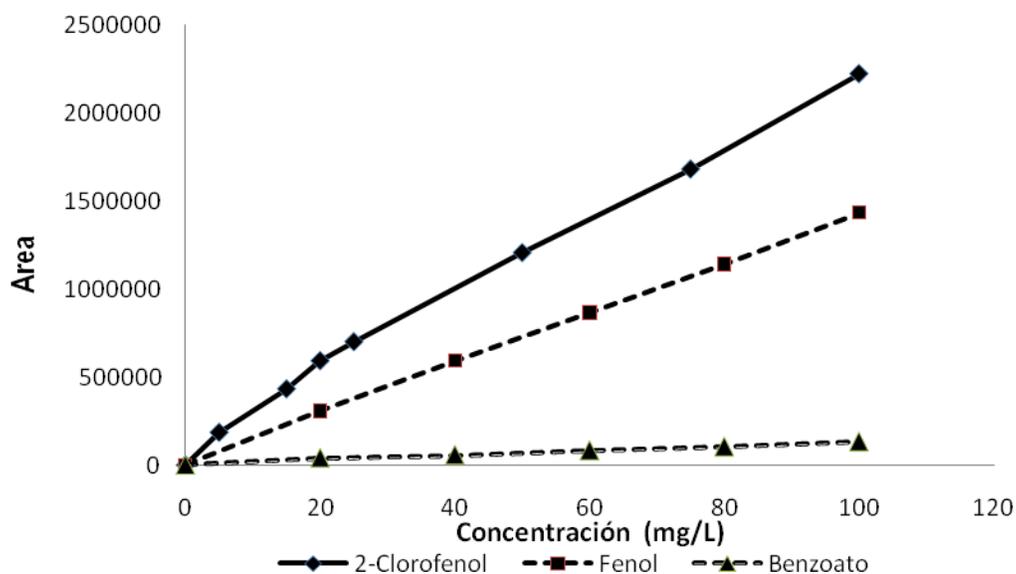


Figura 6. Curvas de calibración de 2-CP, fenol y benzoato

4.2.2 Determinación de (CH₄ y CO₂) por cromatografía de gases (TCD)

La composición de biogás (CH₄ y CO₂) fue determinada en un cromatógrafo de gases HP-3850 con un detector de conductividad térmica (TCD). Las condiciones fueron las siguientes:

- T. Columna: 100°C
- T. Inyector: 50°C
- T. Detector: 100°C
- Gas acarreador: Helio
- Flujo: 25 mL/min

Para la medición del biogás se baso en la ley de los gases ideales, ya que 1 mol de gas a 1 atm y 273°K ocupa 22.4 L. El volumen de gas generado se ajustó a condiciones estándar de presión y temperatura, tomando 0.8 atm de presión atmosférica y 35°C de temperatura. Para realizar la curva de calibración, se prepararon estándares de CH₄ y CO₂ en botellas serológicas de 60 mL, la mezcla de gases ocupó 20 mL correspondientes al espacio de cabeza. Esta curva se realizó por triplicado y se hizo desde 0 a 50 mg/L de metano y dióxido de carbono. En la figura 7 se muestra el perfil de la curva de metano y dióxido de carbono.

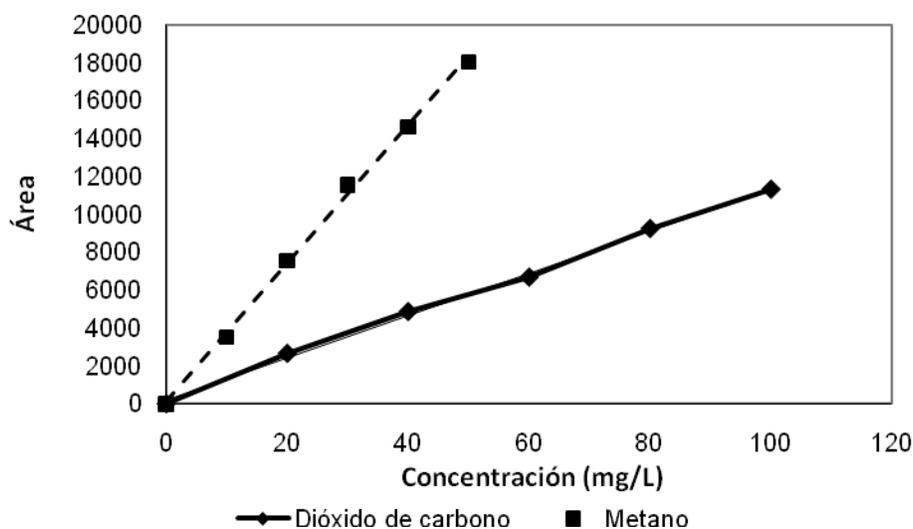


Figura 7. Curva estándar de metano y dióxido de carbono por CG-TCD

4.2.3 Determinación de carbono total y carbono inorgánico por TOC.

La cuantificación de carbono orgánico e inorgánico se realizó por medio de un analizador de carbono orgánico total TOC-5000 (Shimadzu). El equipo se encarga de analizar por separado el carbono total e inorgánico.

Para la preparación de la curva estándar para carbono total se pesaron 2.125 g de Biftalato de potasio en un litro de agua desionizada para evitar interferencia, esto equivale a 1000 mg de C/L, a partir de ésta se hicieron diluciones en un intervalo de concentración de (0-100 mg C/L). En la figura 8 se muestra el perfil resultante de la curva para carbono total.

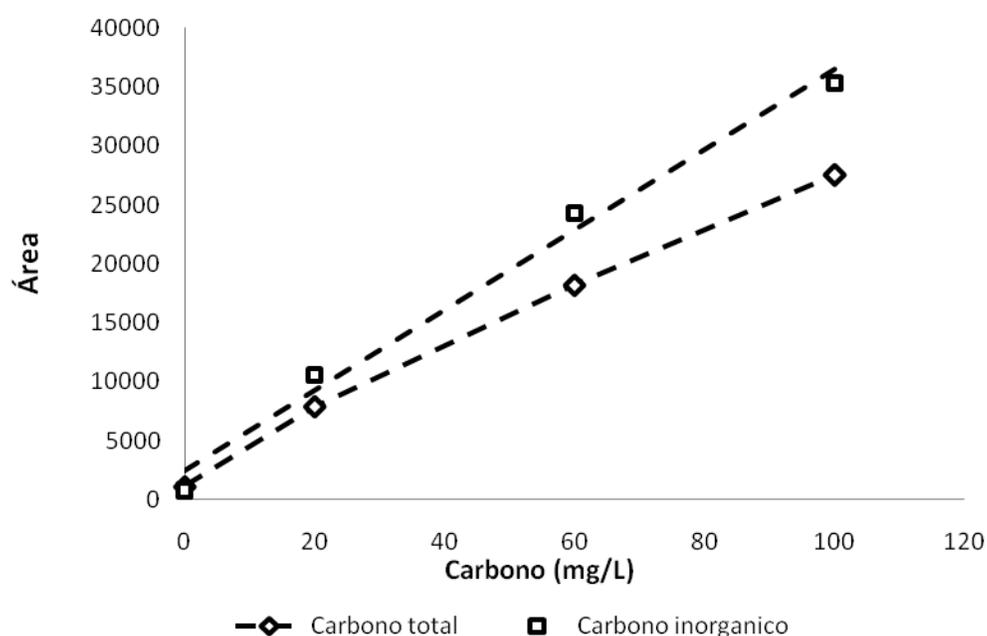


Figura 8. Curva estándar de carbono orgánico total e inorgánico.

Para la preparación de la curva de carbono inorgánico se pesaron 3.5 g de bicarbonato de sodio y 4.41 g de carbonato de sodio en un litro de agua desionizada, esto equivale a 1000 mg de C/L, de ésta se prepararon concentraciones de 0-100 mg/L. En la figura 8 se muestra el perfil de la curva resultante de carbono inorgánico.

4.2.4 Determinación de acetato por cromatografía de gases (FID).

El acetato se cuantificó por cromatografía de gases (CG) con un detector de ionización de flama (FID), columna AT 1000, 0.53 mm x 1.2 mm x 10 m equipado con un inyector automático. Con las siguientes condiciones de operación:

- T. Inyector : 130° C
- T. Columna : 150°C
- T. Detector : 150°C
- Gas acarreador : 4.5 mL de N₂ / min

La curva estándar se realizó por triplicado y se preparó a partir de una solución madre de acetato de sodio con una concentración de 100 mg/L, las concentraciones finales fueron de 0-100 mg/L, cada una de éstas fue acidificada con 50 µL de HCl al 50% y filtradas en membranas de nylon de 0.45 µm de tamaño de poro. En la figura 9 se muestra la curva resultante para la determinación de acetato

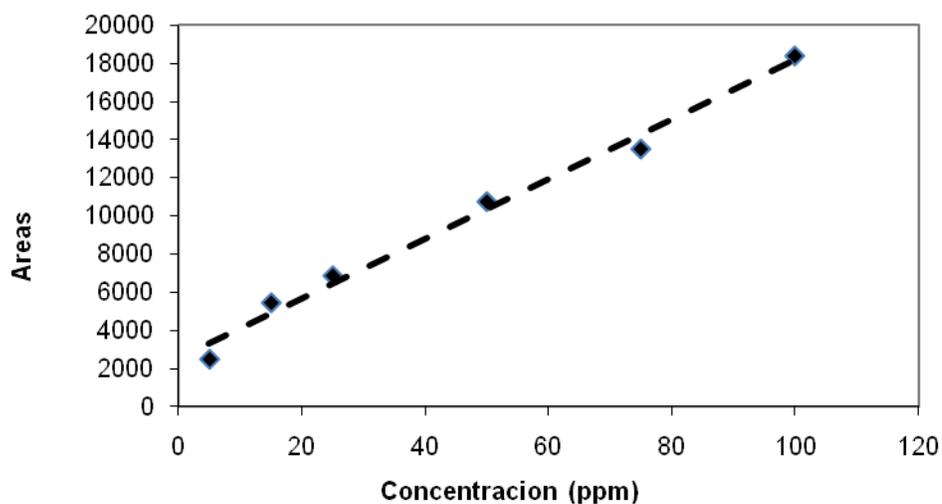


Figura 9. Curva estándar de acetato por CG-FID

4.2.5 Determinación de demanda química de oxígeno (DQO) soluble por la técnica de reflujo cerrado (APHA, 1995)

Esta prueba se realizó para determinar el contenido de materia orgánica de un analito susceptible a la oxidación con base al oxígeno equivalente determinado por el método de reflujo con dicromato de potasio. La curva de calibración se hizo a partir de una solución madre de glucosa a 1500 mg/L, con concentraciones de 0 a 1500 mg/L. Fueron medidos después de su preparación en el espectrofotómetro a 620 nm, en la figura 10 se muestra el perfil de la curva de DQO.

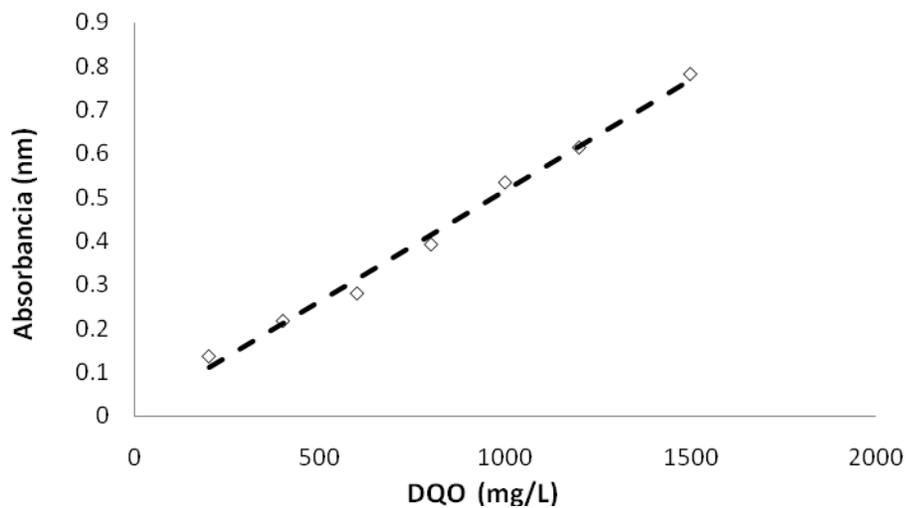


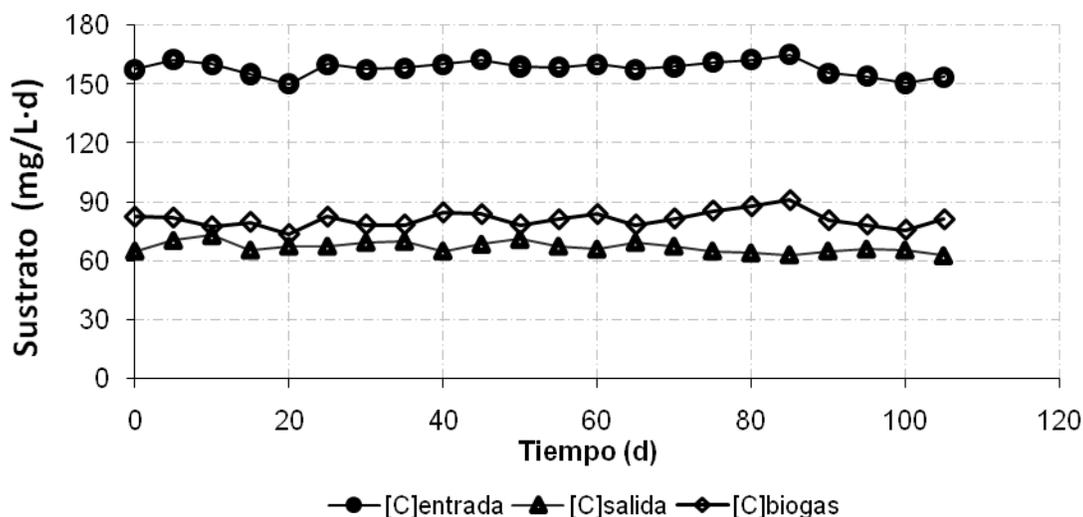
Figura 10. Curva estándar de DQO.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Cultivo en continuo

5.1.1 Reactor metanogénico

Se operó el reactor metanogénico por un periodo de dos meses, después de este tiempo, se observó que la velocidad de salida de carbono con respecto al tiempo tuvo un coeficiente de variación menor que 10% por lo que se puede inferir que se logró obtener el estado estacionario metanogénico del lodo. Se obtuvo una eficiencia de remoción del $60\% \pm 6$ por lo que más de la mitad del carbono alimentado se está consumiendo y el 0.89 de la fracción de este se va para la producción de biogás ($Y_{P/S} 0.89 \pm 0.1$). La Figura 11, muestra el perfil del comportamiento del reactor en estado estacionario, alimentado con acetato como fuente de carbono a una velocidad de $155 \text{ mg de C/L}\cdot\text{d}$. El rendimiento de producción de biogás indicó que el proceso fue desasimilativo. Esto puede deberse a la composición del medio de cultivo el cual se encuentra desbalanceado (relación C/N de 38.6). El proceso metanogénico se mantuvo estable fisiológicamente, por lo que los lodos provenientes de éste se utilizaron para llevar a cabo las pruebas de mineralización en lote.



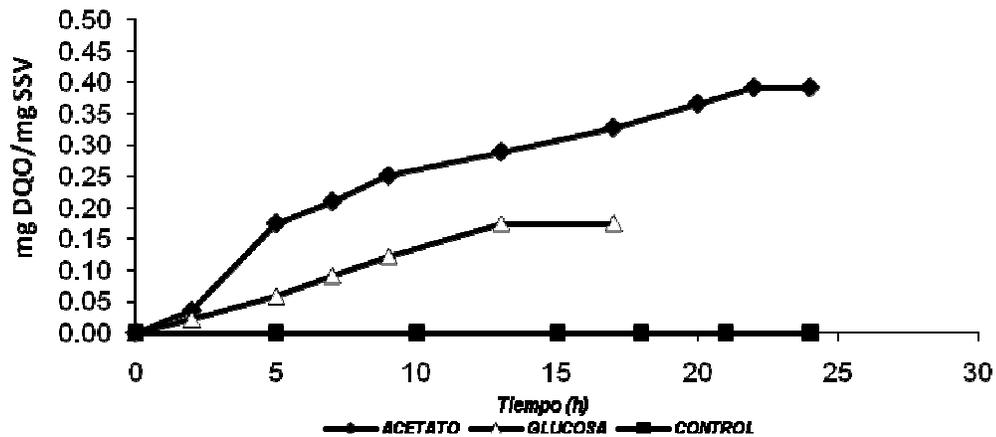
Fi

Figura 11. Velocidades de carga de carbono de acetato y velocidad de producción de biogás.

5.2 Cultivos en lote

5.2.1 Prueba de actividad metanogénica

La prueba de actividad metanogénica se llevó con dos sustratos, glucosa y acetato, bajo las condiciones mencionadas en materiales y métodos (4.1.3.2). Las velocidades específicas de la actividad metanogénica fueron diferentes para cada sustrato. En el caso del acetato se obtuvo una velocidad de 0.03 g DQO/g SSV·h (0.72 g DQO/g SSV·d) y con glucosa 0.01 g DQO/g SSV·h (0.33 g DQO/g SSV·d). La Figura 12 muestra el perfil de comportamiento de la actividad metanogénica cuando se tiene acetato y glucosa como sustrato.



Fi

Figura 12. Actividad metanogénica del inóculo con acetato y glucosa.

De los resultados de actividad metanogénica se observó que es mayor cuando el sustrato es acetato, por este motivo se eligió el acetato como sustrato para la alimentación del reactor y como donador de electrones en las pruebas con 2-clorofenol.

5.3 Pruebas abióticas de volatilidad y adsorción.

El porcentaje de volatilidad y adsorción para cada una de las tres concentraciones probadas por un periodo de 30 días se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Porcentaje de volatilización y adsorción del 2-clorofenol

2-CP Concentración (mg/L)	Porcentaje (%)	
	Volatilizado	Adsorbido
10	8.5±0.6	15.6±0.9
50	3.9±0.3	5.1±0.5
100	3.4±0.4	4.6±0.3

Se puede observar que los porcentajes de volatilización y adsorción son mayores para la menor concentración. La diferencia entre estos valores probablemente se debió a que el error experimental obtenido a concentraciones menores que 20 mg/L es muy alto (mayor que 10%), aunado a esto, el equilibrio que se forma entre la fase líquido y gas a cualquier concentración es la misma, por lo que el porcentaje que está en la fase gas es igual en los dos casos no importando la concentración, por esta razón al realizar los cálculos es de esperarse que sea mayor la volatilización cuando se trata de 10 y 50 mg 2-CP/L.

Se puede observar en la tabla 13, que la adsorción del 2-CP en el lodo, en los tres casos es mayor que la volatilidad, esto se debe a las propiedades fisicoquímicas del compuesto, ya que aunque es poco volátil (presión de vapor 2.9×10^{-3} atm), esta propiedad se ve reducida por la alta solubilidad en agua (28.5 g/L). Esto concuerda con lo mencionado por Mogensen y col. (2003) que reportan que el 2-clorofenol es un compuesto hidrofóbico y poco volátil. El Kow para el 2 CP es 2.16 (Tabla 1), este valor refleja que puede fijarse con firmeza a materia orgánica como membranas celulares de microorganismos. Esta propiedad coincide con lo obtenido experimentalmente, en donde se observa un mayor porcentaje de adsorción con respecto a la volatilidad. El porcentaje de adsorción obtenido se puede comparar con el resultado de Basu y col. (1996), en donde reportan

un 3% de adsorción, este porcentaje es parecido a lo obtenido a 50 y 100 mg de 2-CP/L. El valor de adsorción y volatilidad fueron considerados para la corrección de los ensayos bióticos.

5.4 Prueba para la elección de la concentración de trabajo de 2-CP

Se probaron tres concentraciones de 2-clorofenol (10,50 y 500 mg/L), que equivalen a 5.9, 29.6 y 296 mg C/L respectivamente, en presencia y ausencia de acetato como donador de electrones. Se probaron estas concentraciones ya que en la bibliografía la mayoría de las investigaciones en condiciones anaerobias en lote se realizó en un intervalo por debajo de 50 mg/L. Las figuras 13,14 y 15 muestran el consumo del 2-CP y producción de biogás a través del tiempo, los resultados se expresan en términos de carbono.

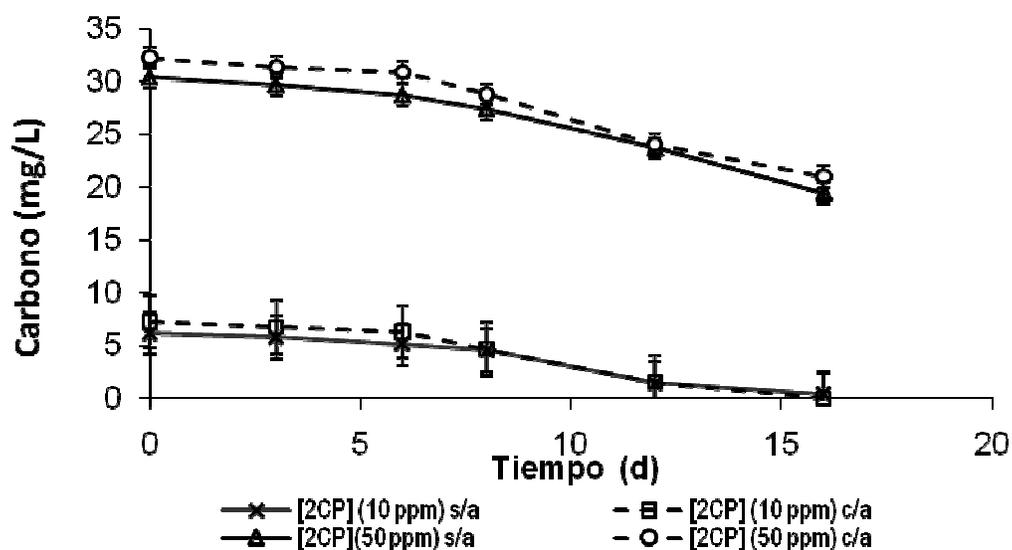


Figura 13. Consumo del 2 CP a concentraciones de 10 y 50 mg 2-CP /L, con acetato (c/a) y sin acetato (s/a).

En las figura 13 se puede observar que el consumo de 2-CP en presencia o ausencia de acetato como donador de electrones es similar en las concentraciones bajas. Para las

concentraciones de 10 y 50 mg 2CP/L hubo producción de biogás como evidencia de mineralización.

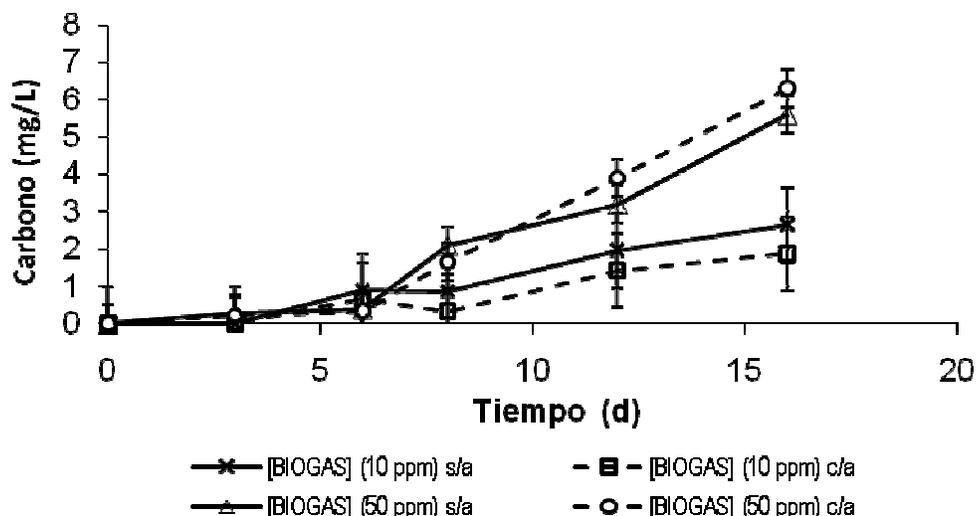


Figura 14. Producción de biogás en presencia y ausencia de acetato a concentraciones de 10 y 50 mg 2-CP /L, sin acetato (s/a) y con acetato (c/a).

A la concentración de 10 mg 2-CP/L se obtiene un coeficiente de variación mayor que 15%, por lo que los resultados obtenidos en esta concentración se consideraron como no confiables. Este coeficiente se ve disminuido a mayores concentraciones (50 y 500 mg 2-CP/L). En la figura 15 se observa a 500 mg 2-CP/L prácticamente no hay actividad biológica, ya que el consumo es casi nulo así como la producción de biogás.

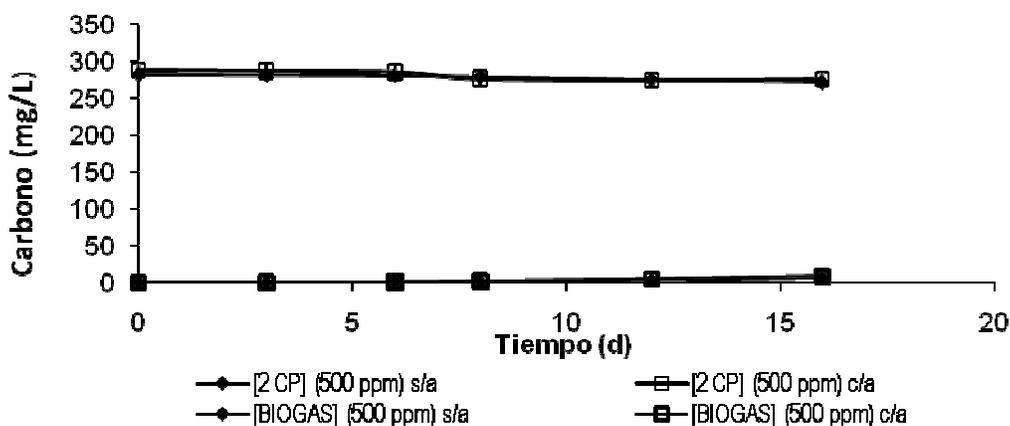


Figura 15. Comportamiento del 2 CP y producción de biogás en presencia y ausencia de acetato a 500 mg 2CP/l. Con acetato (c/a) y sin acetato (s/a).

Lo antes mencionado queda corroborado en la tabla 14, en donde se observan eficiencias, rendimientos y velocidades para cada uno de los casos.

Tabla 14. Eficiencia, rendimiento y velocidades a cada una de las concentraciones de 2-clorofenol.

	10 mg 2CP/L		50 mg 2CP/L		500 mg 2CP/L	
	s/acetato	c/acetato	s/acetato	c/acetato	s/acetato	c/acetato
Eficiencia (%)	93.0±20	100.0±20	36.1±2.1	34.8±2.5	3.8±1.8	4.3±2.1
Rendimiento (Y)	0.46±0.15	0.26±0.17	0.51±0.06	0.56±0.03	0.56±0.02	0.70±0.03
Velocidad (q _s)	0.0012±0.001	0.0018±0.001	0.0014±0.0005	0.0015±0.0005	0.00003±0.00001	0.00002±0.00001

$Y_{p/s}$ (C de biogás/C consumido) q_s (mg de C consumido /g SSV·d)

Como se muestra en la tabla 14, a 10 mg 2-CP/L se tienen eficiencias altas, sin embargo, como se mencionó, el error experimental a esta concentración es alto (mayor 15 %) por lo que se decidió no tomar esta concentración para posteriores pruebas. A la concentración de 500 mg/L las eficiencias y velocidades de consumo son bajas en presencia y ausencia de acetato (3.8± 1.8 y 4.3±2.1), además, la producción de biogás es casi nulo. La concentración que se tomó como base para las cinéticas posteriores fue la de 50 mg/L ya que se consumió el 34.8-36.1% de 2-CP, además, el rendimiento alcanzado ($Y_{\text{BIOGAS}/2\text{-CP}}$) de 0.51-0.56 indica que una fracción del 2-CP se va para la producción de biogás. En la literatura algunos autores como Wiegel y col. (1990), Basu y col. (1996) y Haggblom y col. (1997) trabajaron con cultivos anaerobios en lote en donde utilizaron concentraciones menores que 50 mg/L de clorofenoles. Cabe mencionar que en la bibliografía la máxima concentración de 2-CP utilizada es bajo condiciones aerobias y esta es de 200 mg/L (Farrel y col., 2002), teniendo una eficiencia del 38%, sin embargo, en este estudio hay acumulación de intermediarios carbonados.

5.5 Efecto de diferentes donadores de electrones en la mineralización del 2-clorofenol.

En estas se utilizó una concentración de 50 mg 2-CP/L y diferentes donadores de electrones (acetato, fenol) para conocer cual de estos mejoró la velocidad de consumo y diferentes atmósferas, nitrógeno, helio y CO₂ para conocer si estas intervienen en el consumo del 2-CP.

En la figura 16 se observa el perfil de comportamiento en una atmósfera de dióxido de carbono y acetato como donador orgánico de electrones, se puede observar que hay presencia de fenol lo cual indica que el 2-CP se deshalogena y biogás lo que indica que posteriormente se mineraliza y metaniza. El periodo de consumo es de 38 días y la fase de retardo de 8 días.

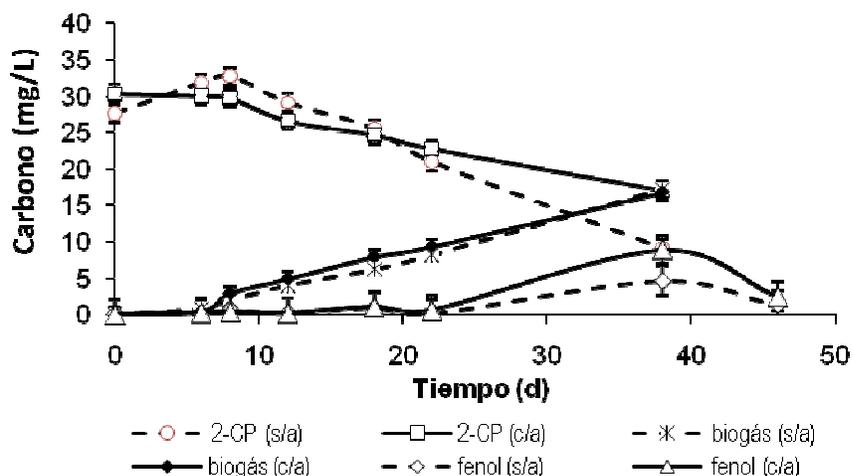


Figura 16. Consumo de 2-CP y producción de biogás, con acetato y dióxido de carbono como atmósfera. Sin acetato (s/a), con acetato (c/a).

En la Figura 17 se muestra el comportamiento del consumo de 2-clorofenol y producción de metano en términos de carbono, con atmósfera de nitrógeno. El periodo de consumo fue de 38 días y la fase de retardo de 8 días.

En ésta se observó que no hay diferencia en el perfil de consumo de 2-CP con o sin acetato como donador orgánico de electrones, sin embargo, no se evaluó si el consumo de acetato fue independiente al 2-CP. La producción de fenol como intermediario, nuevamente indicó que el primer paso de la eliminación de este compuesto fue la decoloración reductora lo cual concuerda con lo reportado en estudios de eliminación por digestión anaerobia (Mikesell y col., 1985, Basu y col., 1996; Becker y col., 1999; entre otros). La presencia de biogás, infiere la metanización y la mineralización del 2-CP. Aunque la producción de biogás fue mayor cuando está en presencia de acetato, esto pudo ser el resultado de la mineralización de forma independiente del acetato, sin embargo, en esta prueba no se monitoreo su consumo.

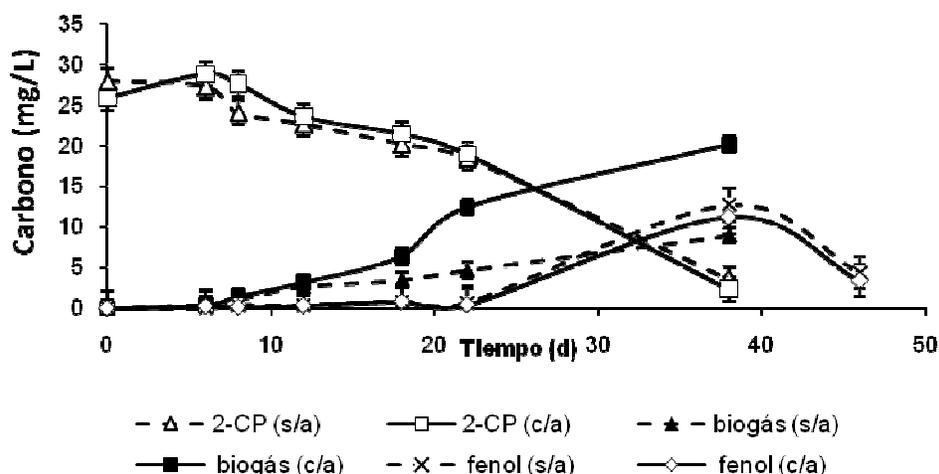


Figura 17. Consumo de 2-CP, producción de biogás en presencia y ausencia de acetato, en atmósfera de nitrógeno. Sin acetato (s/a); con acetato (c/a).

En el caso de la atmósfera de nitrógeno, se observa que aún en ausencia de acetato como donador de electrones hay consumo de 2-CP, eso se puede deber a un metabolito endógeno que puede actuar como donador de electrones o a la presencia de trazas de fenol en el reactivo o por la formación de alguna oxidación química del 2-CP que forme productos que puedan servir como donadores de electrones. Dado que se ha reportado que el fenol puede ser utilizado como donador de electrones, se evaluó este caso en una atmósfera diferente al nitrógeno (helio), ya que en algunos casos se ha encontrado que el consumo de los clorofenoles se puede dar en casos donde solo existe nitrógeno (Boyd y Shelton, 1984, Janke y Novak, 1990). No se utilizó acetato ya que solo se quiso probar

el fenol como donador de electrones. En la figura 18 se observa el perfil de comportamiento del 2-CP utilizando fenol como donador de electrones en una atmósfera de helio y como inóculo un lodo metanogénico con un contacto previo con el 2-CP de 80 días. En el perfil se observa que no se presentó una fase de retardo y el periodo de consumo de 2-CP se redujo a un intervalo de 18-20 días. Además, se produjo fenol como producto de la deshalogenación como intermediario transitorio y biogás como evidencia de la metanización y mineralización del 2-CP.

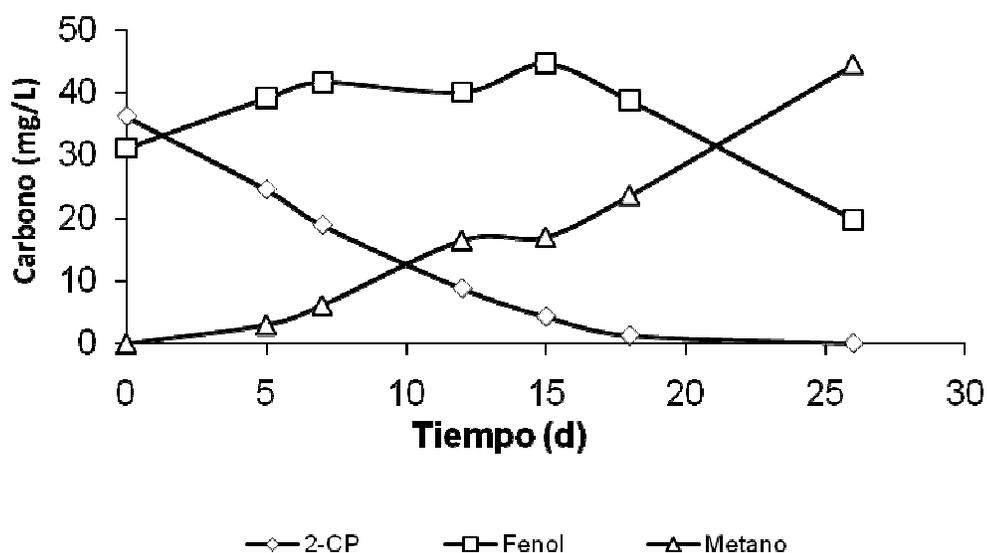


Figura 18. Consumo de 2-CP, producción de biogás con fenol como donadores de electrones en atmósfera de helio.

En la tabla 15 se encuentran reportados las eficiencias, rendimientos y velocidades de consumo para cada uno de los casos. En ésta se puede observar que se tiene mayor eficiencia cuando se trabaja en atmósfera de nitrógeno y helio en comparación con el dióxido de carbono. La baja eficiencia de consumo de 2-CP en el caso del dióxido de carbono puede ser ocasionada por la producción de otros intermediarios como el 3-clorobenzoato (3-CB) que se puede formar como resultado de la carboxilación del 2-CP por presencia de CO_2 y que provocar la disminución el consumo del 2-CP (Becker y col., 1999), sin embargo, en este trabajo no se determinó la presencia de 3-CB.

Tabla 15. Eficiencia, rendimiento y velocidad de consumo del 2-Clorofenol.

Tratamiento	Rendimiento		
	Eficiencia (%)	$Y_{[C]biogas/[C]alim}$	Velocidad (q_s)
Nitrógeno S/A*	87.02±1.3	0.52±0.07	0.0016±0.0005
Nitrógeno C/A**	90.86±1.7	0.86±0.05	0.0018±0.0005
Dióxido S/A*	66.89±2.1	0.95±0.09	0.0013±0.0005
Dióxido C/A**	43.70±2.9	0.78±0.07	0.0010±0.0005
Helio (fenol) ***	100±1.7	0.66±0.05	0.0044±0.0005

* Sin acetato ** Con 29.6 mg/L de acetato *** 41.3 mg/L de fenol. q_s (mg C consumido/g SSV*d)

Se observan incrementos en los rendimientos ($Y_{p/s}$) cuando se utiliza acetato, en las atmósfera nitrógeno esto podría ser debido a la producción de metano a partir del dióxido de carbono y a la mineralización de acetato de forma independiente (Madigan y col., 2004).

No se observa diferencia significativa entre las velocidades de consumo de 2-CP para los casos de nitrógeno y dióxido de carbono en presencia y ausencia de acetato, sin embargo, al utilizar fenol como donador de electrones y lodo aclimatado (en contacto con 2-CP por 80 días) como inóculo se observa un incremento de tres veces la velocidad de consumo (0.0013 a 0.0044 mg C consumido/g SSV*d), este incremento puede deberse principalmente a la presencia de fenol ya que un lodo aclimatado por el mismo tiempo sin adición de fenol sólo incrementa dos veces su velocidad (tabla 16). Estos resultados dan evidencia de que el fenol puede actuar como donador de electrones en la deshalogenación reductiva y mejorar la velocidad de consumo, por lo que probablemente en las cinéticas realizadas anteriormente el fenol podría estar presente como producto de alguna reacción química y posteriormente como parte del metabolismo del 2-CP. Cabe mencionar que en la prueba control con helio y 2-CP hay consumo del mismo aun en ausencia de un donador de electrones, y muestra un perfil similar a cuando la atmósfera es nitrógeno, por lo tanto se descartó que el nitrógeno intervenga en la metanización y mineralización del 2-CP.

5.6 Prueba de mineralización del 2-CP en 50 y 80 días de aclimatación al compuesto.

La concentración inicial para ambos casos fue de 50 mg 2-CP/L, con nitrógeno como atmósfera. En el caso de la segunda alimentación se realizó con el inóculo aclimatado por 50 días (atmósfera nitrógeno), con el objetivo de evaluar el efecto de la aclimatación sobre consumo del 2-CP. Se utilizó acetato para tener monitoreado su consumo e identificar si actúa como donador de electrones. En la figura 19 se muestra el perfil de comportamiento de consumo de 2-CP, producción de fenol, consumo de acetato y producción de biogás.

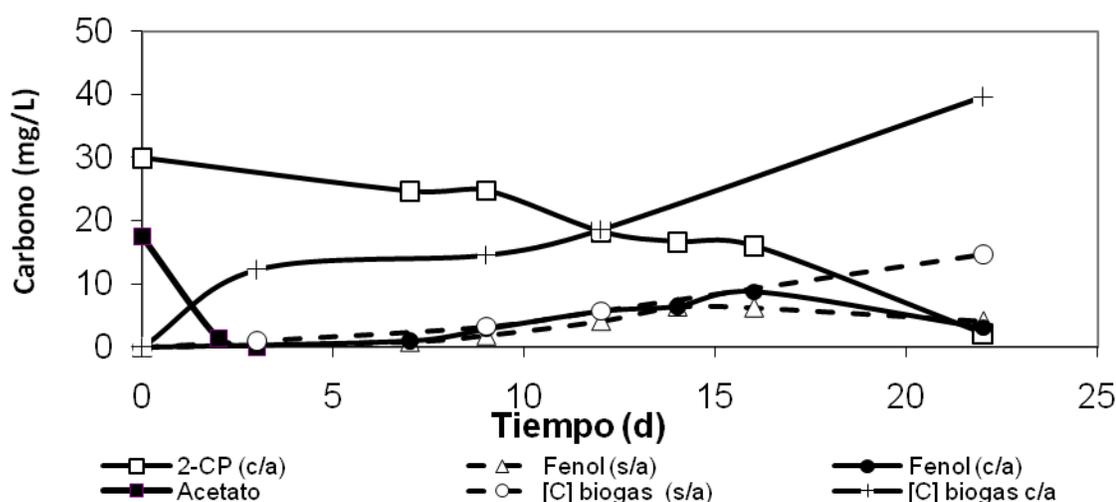


Figura 19. Consumo de 2-CP y acetato, producción de fenol y biogás en una segunda alimentación de 2-CP.

En el perfil de consumo de acetato, se puede observar que el consumo de acetato es de forma independiente al del 2-CP y se lleva a cabo en los primeros dos días de la cinética, al mismo tiempo que se observa el incremento en la formación de biogás (figura 19), dado que el consumo de 2-CP inicia después de 8 días, la producción de biogás en los primeros dos días proviene únicamente de la mineralización del acetato.

En la tercera adición de 2-CP, se utilizó como inóculo lodo metanogénico con un contacto previo al compuesto de 80 días (figura 20).

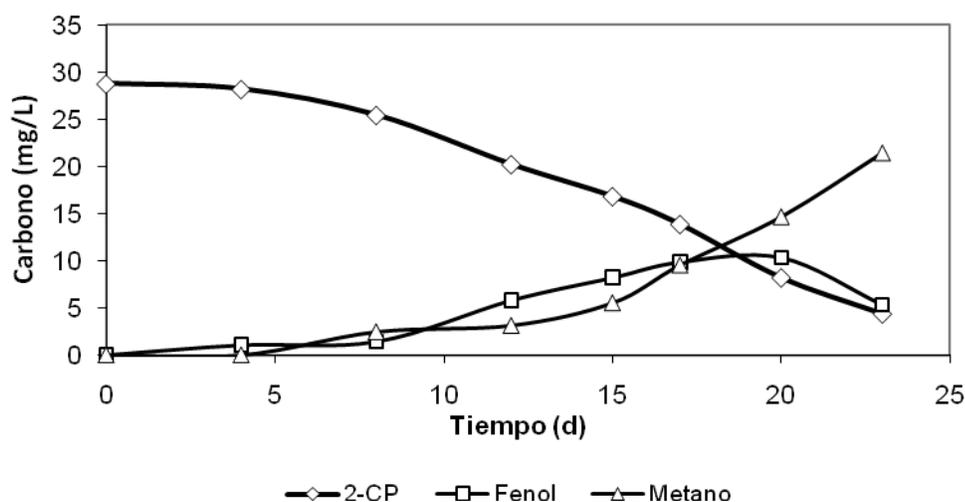


Figura 20. Consumo de 2-CP, producción de fenol en una tercera alimentación de 2-CP.

En ambas alimentaciones se observó producción de fenol como intermediario, por lo que probablemente la ruta metabólica del 2-CP no fue modificada por los periodos de aclimatación. El tiempo de consumo se reduce en un 50% en comparación con el lodo sin aclimatación, sin embargo, entre 50 días y 80 días de aclimatación no se observa diferencia. La tabla 16 muestra la velocidad de consumo, eficiencia de consumo, rendimientos y fases de retardo, en los diferentes tiempos de aclimatación bajo las mismas condiciones (atmósfera de nitrógeno y sin acetato).

Tabla 16. Variables de respuesta de las cinéticas de adaptación del lodo al 2-CP.

	TIEMPOS DE ACLIMATACIÓN (DÍAS)		
	0	50	80
Velocidad (q_s)	0.0014±0.0005	0.0022±0.0005	0.003±0.0005
Eficiencia (%)	87.14±2.43	81.64 ± 2.13	84.85 ± 2.23
Rendimiento $Y_{[C]_{biogas}/[C]_{alim}}$	0.84±0.10	0.70 ± 0.12	0.88 ± 0.08
Fase de retardo (d)	8±1	6±1	3±1

La eficiencia de consumo y rendimiento no se ven afectadas por el contacto previo del inóculo al 2-CP, ya que no se observa diferencia significativa en cada una de las cinéticas. Se puede observar que la fase de retardo disminuye conforme aumenta el tiempo de contacto con el 2-CP teniendo una reducción en la cuando el inóculo es

aclimatado por 80 días (tercera alimentación) de un 62.5% (3 días) con respecto al inóculo sin adaptar. Esto concuerda con lo mencionado por Fen-xia Ye y Dong-sheng. (2004), quienes sugieren que un periodo de 100 días de aclimatación reduce la fase de retardo.

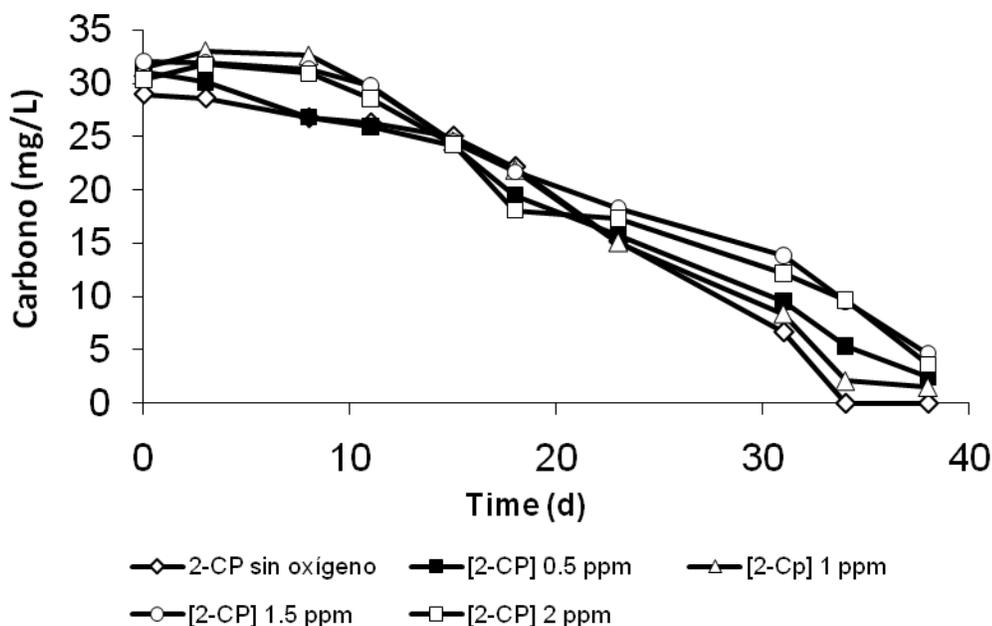
La velocidad específica de consumo del 2-CP aumenta 57% y 114% en un tiempo de aclimatación al 2-CP de 50 y 80 días -CP respectivamente. Buitrón y col. (1998) mencionan que con un contacto previo del 2-CP al inóculo, obtienen un aumento de velocidad específica de consumo, este aumento coincide con lo obtenido en este experimento.

Aun cuando para mejorar la velocidad de consumo del 2-CP, se requirió de un periodo de aclimatación de 80 días, la mayoría de los autores mencionan tiempos de aclimatación mayores. Por ejemplo, Basu y col. (1996) reportan que después de un tiempo de contacto al 2-CP de 200 días inició el consumo teniendo una velocidad específica de consumo de 0.0019 mg C/g SSV·d, menor a la obtenida con 80 días de aclimatación de lodo (tabla 16). Becker y col. (1999) obtuvieron una eficiencia de consumo del 68.5% cuando alimentaron 25 mg 2-CP/L en condiciones metanogénicas empleando cultivos aclimatados previamente por 70 días y utilizando una mezcla de $N_2/CO_2/H_2$ (85/10/5), obteniendo una eficiencia menor a la obtenida en estos ensayos.

5.7 Cinéticas en lote con oxígeno

5.7.1 Cinéticas de mineralización del 2-clorofenol en presencia oxígeno

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto del oxígeno en la mineralización del 2-CP en condiciones metanogénicas, por lo que se probaron cuatro concentraciones diferentes de oxígeno (0.5-2 mg O₂/L). Se utilizó una concentración de 50 mg 2-CP/L, con una atmósfera de nitrógeno y como inóculo lodo metanogénico sin contacto previo al 2-CP. En las figuras 21 y 22, se muestran los perfiles de consumo del 2-clorofenol y de producción de fenol como intermediario en cada una de las concentraciones ensayadas. Se puede observar que el perfil de consumo en todos los casos es similar al control (sin oxígeno), por lo que se puede inferir que el oxígeno no tiene efecto sobre el consumo de 2-CP.



Fig

ura 21. Consumo de 2-CP, en la primera alimentación de 2-CP, en presencia de oxígeno

Hay producción de fenol como intermediario, lo cual sugiere que se está llevando a cabo la dechloración reductora como primer paso de la mineralización del 2-CP, sin embargo, se

puede observar que al incrementar la concentración de oxígeno disminuye la producción de fenol hasta un 58 %.

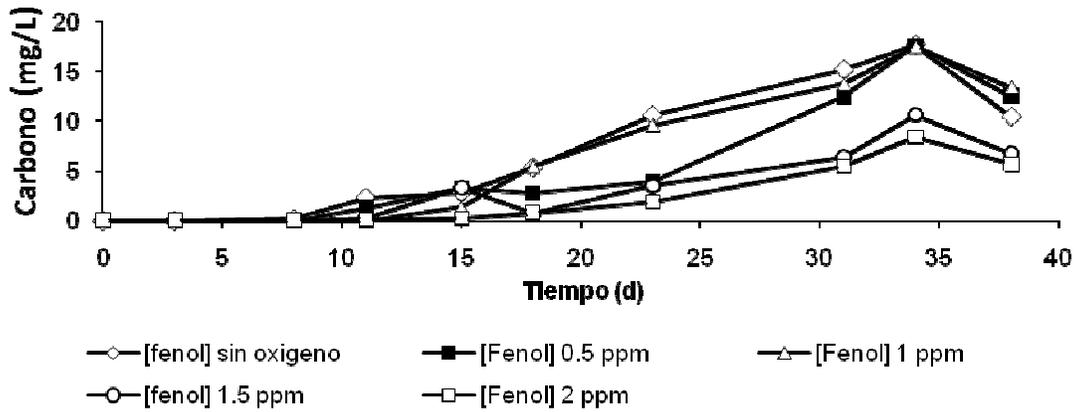


Figura 22. Producción de fenol en la primera alimentación de 2-CP, en presencia de oxígeno

Por otra parte, no se observó que el oxígeno tenga efecto positivo sobre la disminución de la fase de retardo, ya que ésta es de 8-10 días, similar a las cinéticas anteriores en donde el inóculo no tuvo contacto previo al 2-CP.

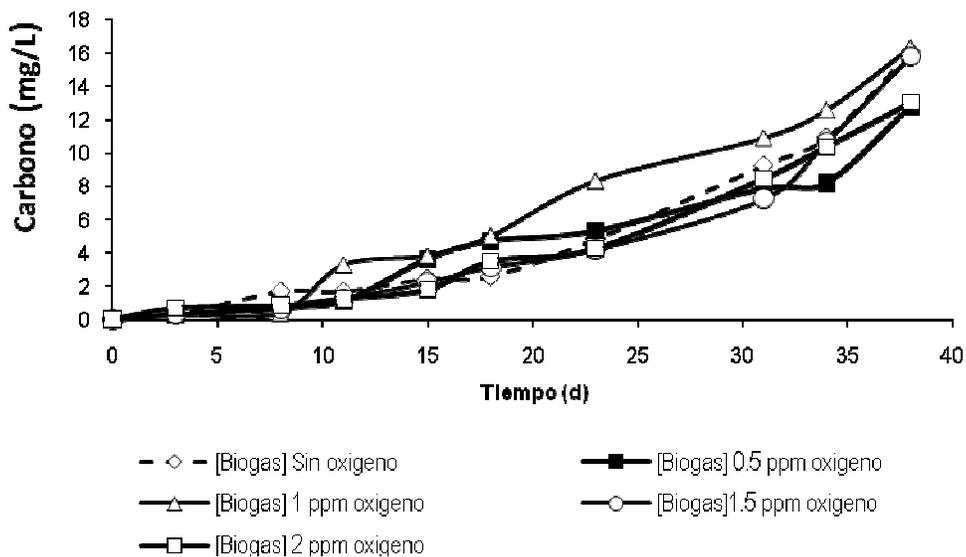


Figura 23. Producción de biogás con inóculo sin aclimatar a 2-CP, en presencia de oxígeno.

El perfil de producción de biogás ($Y_{p/s}$) fue similar en todos los casos (Fig. 23). Lo cual da evidencia de que se está mineralizando una fracción del 2-CP consumido. Sin embargo, la relación metano-dióxido de carbono disminuyó, siendo menor la producción de metano, esto se aprecia en el rendimiento ($Y_{\text{Metano/S}}$), ver tabla 17.

Tabla 17. Variables respuesta de las cinéticas en la primera alimentación de 2-CP, con diferentes concentraciones de oxígeno.

PRIMERA ALIMENTACIÓN					
Oxígeno mg/L	0	0.5	1	1.5	2
Velocidad (q_s)	0.0015±0.0003	0.0012±0.0005	0.0013±0.0002	0.0015±0.0003	0.0014±0.0004
Eficiencia (%)	100±2.3	92.17±3.2	95.28±3.1	85.40±2.4	88.01±3.1
Rendimiento $Y_{[C]_{\text{metano}}/[C]_{\text{alim}}}$	0.76±0.11	0.64±0.09	0.43±0.13	0.4±0.08	0.38±0.09

q_s (mg C consumido/ mg SSV*d)

Se observa que el rendimiento de producción de metano ($Y_{\text{Metano/S}}$) decrece conforme aumenta la concentración de oxígeno, teniendo una disminución del rendimiento en un 50% en la máxima concentración de oxígeno (2mg/L). Mohn y Tiedje (1992) mencionan que la adición de oxígeno puede reducir la producción de metano en la digestión anaerobia, lo cual se ve reflejado en este experimento. La eficiencia y velocidad específica para cada uno de los casos no presenta diferencia significativa con la adición de oxígeno, por lo cual queda evidenciado que el oxígeno no mejora estos parámetros.

En la tabla 18, se muestran los porcentajes de producción de fenol con respecto a un control anaerobio. En esta se observa que la producción de fenol disminuye con la presencia de oxígeno. Esta disminución se puede deber a un posible cambio en la ruta metabólica. Es decir, aunque se puede llevar a cabo la decoloración reductiva (ruta anaerobia) dado que el cultivo no está saturado con oxígeno, una fracción del 2-CP se puede estar consumiendo por una vía alterna, esta podría ser la ruta aerobia en donde los principales intermediarios son los clorocatecoles (Farrel y col., 2000), dando como resultado intermediarios diferentes al fenol.

Tabla 18. Porcentaje de formación de fenol en cada tratamiento.

mg O ₂ /L	% FENOL
0.5	93.4±3.2
1	77.7±4.6
1.5	50.3±4.9
2	42.1±3.8

Realizando el balance de materiales (tabla 19) se puede observar que el carbono se encuentra presente como 2-CP, fenol y biogás (CH₄ y CO₂), sin embargo, hay una fracción de carbono faltante (26%) dentro del balance que incrementa conforme la concentración de oxígeno aumenta. El faltante de carbono final puede ser explicado como un intermediario formado en una vía metabólica alterna como se mencionó anteriormente.

Tabla 19. Balance de carbono final de la cinética en presencia de oxígeno.

Tratamiento	Inicial [mg/L]		Final [mg/L]				
	[O ₂]	[C] de 2-CP	[C] de 2-CP	[C] Fenol	[C] Biogás	[C] Total final	[C] Faltante
0		28.9±2.9	0	10.4±1.3	16.0±1.8	26.4±2.1	2.4±0.8
0.5		31.0±1.9	2.4±2.1	12.5±1.5	12.7±2.3	27.7±0.7	3.3±1.2
1		31.5±2.5	1.4±1.6	9.4±1.3	16.3±1.2	27.3±1.1	4.1±1.0
1.5		32.0±2.2	4.6±1.8	6.7±1.9	15.7±1.8	27.2±1.7	4.8±1.2
2		30.3±1.8	3.6±2.2	5.6±1.5	13.0±1.8	22.3±1.5	8.0±1.3

Debido a que en cinéticas anteriores se observó que el contacto previo del inóculo con el 2-CP aumenta la velocidad específica de consumo, se evaluó el efecto de un contacto previo al 2-CP y al oxígeno sobre el inóculo. Con una concentración de 50 mg 2CP/L y una atmósfera de nitrógeno se probaron cuatro concentraciones diferentes de oxígeno (0.5-2 mg O₂/L).

En las figuras 24 y 25, se muestra el comportamiento del consumo del 2-clorofenol y la producción de biogás, con las diferentes concentraciones de oxígeno y el control en ausencia de oxígeno.

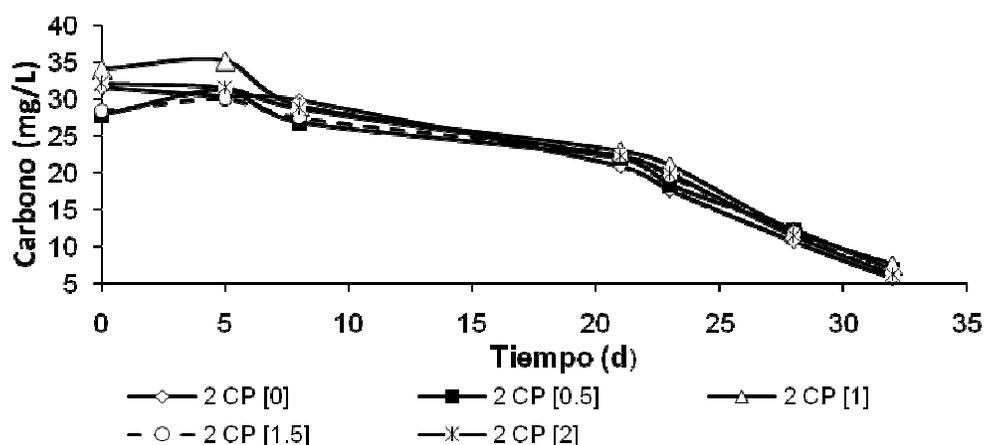


Figura 24. Consumo de 2-CP, con el inóculo aclimatado por 40 días al 2-CP y oxígeno.

En los perfiles se puede observar que el comportamiento en el consumo de 2-CP y la producción de biogás es similar no importando la concentración de oxígeno adicionada.

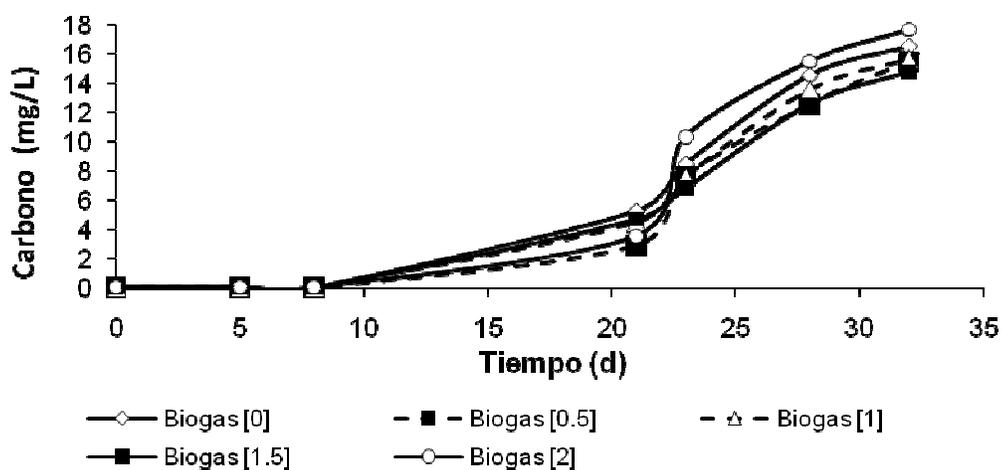


Figura 25. Producción de biogás con el inóculo aclimatado por 40 días al 2-CP y oxígeno.

Se puede observar en la tabla 20, que tanto en la primera como en segunda adición de 2-CP, las diferentes concentraciones de oxígeno no provocan diferencias en velocidades específicas de consumo y eficiencias

Se observa un cambio en la velocidad específica de consumo de 2-CP entre la primera y segunda alimentación, sin embargo, estos son debidos a el efecto de la aclimatación

Tabla 20. Variables respuesta de las cinéticas en la primera, segunda alimentación de 2-CP, con diferentes concentraciones de oxígeno.

SIN ACLIMATACIÓN					
[Oxígeno] mg/L	0	0.5	1	1.5	2
Velocidad (q_s)	0.0015±0.0003	0.0012±0.0005	0.0013±0.0002	0.0015±0.0003	0.0014±0.0004
Eficiencia (%)	100±2.3	92.17±3.2	95.28±3.1	85.40±2.4	88.01±3.1
Rendimiento $Y_{[C]_{metano}/[C]_{alim}}$	0.76±0.11	0.64±0.09	0.43±0.13	0.4±0.08	0.38±0.09
CON 40 DIAS DE ACLIMATACIÓN AL 2-CP Y OXÍGENO					
[Oxígeno] mg/L	0	0.5	1	1.5	2
Velocidad (q_s)	0.0026±0.0005	0.0023±0.0005	0.0022±0.0003	0.0022±0.0004	0.0025±0.0003
Eficiencia (%)	81.88±3.6	75.23±6.4	77.91±3.7	78.94±3.6	80.77±2.4
Rendimiento $Y_{[C]_{metano}/[C]_{alim}}$	0.81±0.09	0.66±0.1	0.48±0.13	0.35±0.15	0.33±0.12

q_s (mg C consumido/g SSV*d)

Al igual que en la primera alimentación, el efecto del oxígeno solo se observa en la disminución de producción de metano reflejado en el rendimiento ($Y_{Metano/S}$) y en la disminución de la producción de fenol.

El periodo de aclimatación del inóculo al 2-CP y oxígeno influyó en la fase de retardo, ya que ésta disminuyó en un 38%. El tiempo de consumo del 2-CP sólo se redujo en un 11%, aun cuando la velocidad específica de consumo aumentó un 73% (tabla 21). Estos valores son similares a los obtenidos en condiciones anaerobias y con 50 días de aclimatación (tabla 16). Wiggings y col. (1987), sugieren que durante el periodo de aclimatación existe una multiplicación de microorganismos especializados en el consumo de compuestos tóxicos. En comunidades aerobias, los periodos de aclimatación son de horas o algunos días (Wiggings y col., 1987, Timothy y col., 1989), pero para comunidades anaerobias estos periodos típicamente llevan dos semanas o hasta seis meses (Horowitz y col., 1983). Feng-xia y Dong-sheng (2004), mencionan que se debe tener una atención especial en las comunidades microbianas ya que juegan un papel importante en este tipo de procesos.

6. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se evaluó el efecto de diferentes donadores de electrones y del oxígeno en la metanogénesis del 2-CP en ensayos en lote, para esto se dividió en dos partes: cinéticas bajo condiciones metanogénicas y cinéticas en condiciones metanogénicas en presencia de oxígeno. Se evaluó el efecto de la aclimatación al 2-CP, en ambos casos.

Los resultados obtenidos permiten concluir que:

- I. En condiciones metanogénicas.
 - El acetato no actúa como donador de electrones en la mineralización del 2-clorofenol.
 - El fenol adicionado o producido actúa como donador de electrones en la mineralización y metanización del 2-CP, además, ayuda a aumentar la velocidad específica de consumo.
 - Después de un periodo de aclimatación de 80 días al 2-CP la velocidad específica de consumo del 2-CP aumentó significativamente de 0.0014-0.003 mg c/g SSV-d y la fase de retardo disminuyó en un 38 %.

- II. En condiciones metanogénicas en presencia de oxígeno.
 - La metanización del 2-CP disminuye, reflejado en los rendimientos de producción de metano.
 - El oxígeno no tiene efecto sobre la eficiencia y velocidad de consumo de 2-CP.
 - La producción de fenol se reduce en un 42 % y aumenta la producción de dióxido de carbono (CO₂), probablemente debido a un cambio en la ruta metabólica o acumulación de algún intermediario.

13. BIBLIOGRAFIA

1. Annachatre A.P. y Gheewala S.H. (1996). Biodegradation of chlorinated phenolic compounds. *Biotechnol. Adv.* **14**: 35–56.
2. Atuanya E. I, Purohit H. J y Chakrabarti T. (2000), Anaerobic and aerobic biodegradation of chlorophenols using UASB and ASG bioreactors. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **16**: 95-98.
3. ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2005). Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act (CERCLA) priority list of hazardous substances. Available from: <<http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/05list.html>>.
4. Bradberry S. M; Proudfoot, A. T; Vale, J. A. (2004). **Poisoning Due to Chlorophenoxy Herbicides**, *Toxicological Reviews* **23**:65-73.
5. Basu S. K, Oleszkiewicz J. A. y Sparling R. (1996) Dehalogenation of 2-Chlorophenol in anaerobic batch cultures. *Elsevier Science.* **30**: 315-322.
6. Becker G. J, Sthal D. A. y Rittmann B. E. (1999). Reductive Dehalogenation and concersion or 2-Chlorophenol to 3-Chlorobenzoate in a Methanogenic Sediment Community: Implication for Predicting the Environmental fate of Chlorinated Pollutants. *Applied and Environ. Microbiol.* **65**:5169-5172.
7. Boyd S. y Shelton, D. (1984) Anaerobic biodegradation of chlorophenols in fresh and acclimated sludge. *Applied and Environ. Microbiol.* **47**(2):272-277.

8. Buitron G., Gonzalez, A. y Lopen-Marín, L.M. (1998). Biodegradation of phenolic compounds by an acclimated activated sludge and isolated bacteria. *Water Sci. Technol.* **37**:371–378.
9. Davoren M. y Fogarty M.A. (2005). Ecotoxicological evaluation of the biocidal agents sodium *o*-phenylphenol, sodium *o*-benzyl-*p*-chlorophenol, and sodium *p*-tertiary amylphenol, *Ecotoxicity and Environmental safety.* **60**:203-217.
10. Farrel A. y Brid Q. (1999). Degradation of mono-chlorophenols by mixed microbial community via a *meta*-cleavage pathway, *Biodegradation,* **10**:353-362.
11. Fava F., Armenante PM y Kafkewitz D Aerobic Degradation and dechlorination of 2-chlorophenol, 3-chlorophenol and 4-chlorophenol by a *Pseudomonas Pickettii* strain (1995), *Lett. Appl. Microbiol.* **21**:307-312.
12. Fee, J.A., Is Superoxide Important in Oxygen Poisoning? (1992). *Trends Biochem. Sci.* **7**: 84-86
13. Fen-xia Ye y Dong-sheng S. (2004), Acclimation of anaerobic sludge degrading chlorophenols and the biodegradation kinetics during acclimation period, *Chemosphere.* **54**: 1573-1580.
14. Gantzer C.J y Wackett L.P., 1991, Reductive Dechlorination Catalyzed by Bacterial Transition-Metal Coenzymes, *Environ. Sci. Technol.* **25**: 715-722
15. Garibay O. C, Rios L. E, Garcia M. J, Poggi V. H. M. (2005). 2,4,6-trichlorophenol and phenol removal in methanogenic and partially-aerated

- methanogenic conditions in a fluidized bed bioreactor. *Journal of chemical technology and biotechnology*. **80**:1180-1187.
16. Gottschalk G. y Peinemann, S. (1992). The Anaerobic Way of Life, In Balows, A., Tramper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.-H. (eds.), *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, **1**: 300-311
17. Häggblom M. (1990), Mechanisms of bacterial degradation and transformation of chlorinated monoaromatic compounds, *J. Basic Microbiol.* **30**: 115–141.
18. Häggblom M.M, Rivera M.D y Young L. Y, (1993). Influence of alternative Electron Acceptors on the Anaerobic Biodegradability of Chlorinated Phenols and Benzoic Acids. *Applied and Environmental Microbiology* **59**(4): 1162-1167.
19. Hungate R.E., (1969). A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes, In Norris, J. B. and Ribbons, D. W. (eds.), *Methods in Microbiology*, **3**:117-132
20. Kato M, Field J.A. y Lettinga G. (1997) Anaerobe tolerance to oxygen and the potentials of anaerobic and aerobic cocultures for wastewater treatment *Braz. J. Chem. Eng.* **14**: 1-14
21. Knackmuss H. J. y Reineke. W. (1988). Microbial degradation of haloaromatics. *Annual Review of Microbiology*. **42**: 263-287.

22. Kohring G.-W., Zhang X., and Wiegel J. (1989). Anaerobic dechlorination of 2,4-dichlorophenol in freshwater sediments in the presence of sulfate. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:2735-2737.
23. Loehr R.C.Krishnamoorthy, R. (1998) Terrestrial bioaccumulation potential of phenolic compounds, *Hazardous Waste and Hazardous Materials*, **5**:2-9.
24. Madigan M. T., Martinko J. M y Parker J. (2003). Brock biología de los microorganismos. 10° edición, ed Prentice Hall, España, pp 448,540, 573-574, 576-578.
25. Majumber S. M, y Gupta S.K. (2007), Removal of chlorophenols in sequential anaerobic–aerobic reactors, *Bioresource Technology*, **98**:118-129.
26. Mars AE, Kasberg T, Kaschabek SR, Van Agteren MH, Janssen DB & Reineke W (1997). Microbial degradation of chloroaromatics: Use of the *meta*- cleavage pathway for mineralization of chlorobenzene. *J. Bacteriol.* **179**: 4530–4537.
27. Mikesell M. D. y Boyd S.A. (1985). Reductive dechlorination of the pesticides 2,4-D, 2,4,5-T and Pentachlorophenol in Anaerobic Sludges. *J. Environ. Qual.* **14**:337-340
28. Miller, R.M., Singer, G.M., Rosen, J.D., Bartha, R. (1988). Sequential degradation of chlorophenols by photolytic and microbial treatment. *Environ. Sci. Technol.* **22**, 1215–1219.

29. Mogensen S. A, Dolfing J., Haagensen F., Ahring B.K. (2003). Potential for anaerobic conversion of Xenobiotics. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. **82**:109-115
30. Mohn W.W y Kennedy K.W (1992) Limited degradation of chlorophenols by anaerobic sludge granules. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2131-2136.
31. Mohn W.W y Tiedje, J.M (1992) Microbial reductive dehalogenation. *Microbiology review* **56**:482-507.
32. Morris J.G., Nature of Oxygen Toxicity in Anaerobic Microorganisms (1979). In Strategies of Microbial Life in Extreme Environments. Shilo, M. (ed.), Verlag Chemie, Weinheim, Germany pp. 149-162.
33. Narasimhan T.R, Mayura K, Clement B.A, Safe S.H , Phillips T.D. (1992). Effects of chlorinated phenols on rat embryonic and hepatic mitochondrial oxidative phosphorylation. *Environmental Toxicology and Chemistry* 805–814.
34. Novak J. y Janke D (1990) Reductive dechlorination of 2,6-dichlorophenol in an anaerobic bioreactor. *Organohalogen compounds, Toxicology environmental, food expositure risk.* **1**: 363-366.
35. Parker W.J., Farquhar G.F. y Hall E.R (1993). Removal of chlorophenolics and toxicity during high-rate anaerobic treatment of segregated kraft mill bleach plant effluents. *Environ. Sci Technol.* **27**:1783-1789.
36. Pfenning, N. (1978). Formation of Oxygen and Microbial Processes Establishing and Maintaining Anaerobic Environment In: Strategies of

- Microbial Life in Extreme Environments. Shilo, M. (ed.), Verlag Chemie, Weinheim, Germany pp. 137-148.
37. Rolfe, R.D.; Hentges, D.J.; Campbell, B.J. y Barret, J.T. (1978). Factors Related to the Oxygen Tolerance of Anaerobic Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**: 306-313
38. Sahinkaya E. y Dilek F.B. (2006). Biodegradation of 4-CP and 2,4-DCP mixture in a rotating biological contactor (RBC). *Biochemical Engineering Journal* **31** (2) 141–147.
39. Schmidt E., Hellwig M. y Knackmuss H.J. (1983). Degradation of chlorophenols by a defined mixed microbial community. *Appl Environ Microbiol.* **46**: 1038–1044.
40. Scott, R.I.; Williams, T.N.; Whitmore, T.N. y Lloyd, D. (1983). Direct Measurement of Methanogenesis in Anaerobic Digestors by Membrane Inlet Mass Spectrometry *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 236-241.
41. Smith, J.A., Novak, J.T. (1987). Biodegradation of chlorinated phenols in subsurface soils. *Water Air Soil Pollut.* **33**:29–42.
42. Sharak Genthner, B. R., W. A. Price II, y P. H. Pritchard. (1989) Anaerobic degradation of chloroaromatic compounds in aquatic sediments under a variety of enrichment conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:1466-1471.
43. Sulflita J.M., Horowitz D.R., Shelton D.R. y Tiedje J. M. (1987). Dehalogenation: a novel pathway for the anaerobic biodegradation of haloaromatic compounds. *Science* **218**:1115-1117.

44. Timothy, G.L., Suflita, J.M., James, M.T., (1989). Characterization of the acclimation period before anaerobic dehalogenation of halobenzoates. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2773–2778
45. Veeken, A., Sanders, W. (2002) Analysis and optimization of the Anaerobic Digestion Of the Organic Fraction of Municipal Solid Waste. USA.
46. Weiser M, Eberspacher J, Vogler B. y Lingers F, Metabolism of 4-chlorophenol by *Azotobacter* sp. GP1: Structure of the meta-cleavage product of 4-chlorocatechol (1994), *Microbiol. Lett* **116**: 73-78.
47. Wiggings, B.A., Jones, S.H., Alexander, M.A., (1987). Explanations for the acclimation period preceding the mineralization of organic chemicals in aquatic environments. *Appl Environ. Microbiol.* **53**:791–796.
48. Wijffels, R.H.; Eekhof, M.R.; Tramper, J.; de Beer, D. y Van den Heuvel, J.C., Growth and Substrate Consumption by Immobilized *Nitrobacter agilis*: Validation of a Dynamic Model (1991), In Proc. of the International Symposium of Environmental Biotechnology. Vol. II. Royal Flemish Society of Engineers, Oostende, Belgium pp. 697-699.
49. World Health Organization (WHO), (1993). Chlorophenols other than pentachlorophenol. Environmental Health Criteria 93. WHO, Geneva.
50. Whitman, W.B.; Bowen, T.L. y Boone, D.R. (1992). The Methanogenic Bacteria In the Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Balows, A., Tramper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.-H. (eds.).