



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

ESPECIALIZACION DE BIOTECNOLOGIA

Degradación del 2-Clorofenol y fenol por lodos metanogénicos

ALUMNA:
SIERRA VICENTE CRUZ AURELIA

ASESORA:
Dra. Florina Ramírez Vives

Firma

México, D. F. a 6 de Abril de 2010

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

Los contaminantes presentes en el medio acuático son el reflejo de las sustancias químicas empleadas en procesos industriales y en la formulación de productos comerciales. Los clorofenoles son compuestos orgánicos muy tóxicos y ampliamente distribuidos en el medio ambiente ya que existe una larga tradición de su empleo debido a sus propiedades físicas y químicas, que les dan aplicaciones como disolventes, fitosanitarios, preservadores de madera, limpiadores, etc. En otras ocasiones los compuestos organoclorados aparecen en forma de subproductos en procesos químicos en los que intervienen el cloro o sus derivados, como es el caso del blanqueo de pasta de papel o la cloración del agua. Debido a sus propiedades antimicrobianas, se les ha utilizado para preservación de la madera, pinturas, fibras vegetales, cuero, y como desinfectantes.

Los clorofenoles son compuestos químicos orgánicos en los cuales uno o más átomos de hidrógeno del fenol son remplazados por uno o más átomos de cloro. Hay 5 tipos básicos de clorofenoles (mono, di, tri, tetra y pentasustituidos) y 19 clorofenoles diferentes. La mayoría de los clorofenoles son sólidos a temperatura ambiente excepto el 2- cloro fenol (2-CP). El 2-clorofenol es un líquido incoloro o de color ámbar, con un olor desagradable, soluble en alcohol, éter y soluciones alcalinas. El 2-CP es un compuesto con una solubilidad en agua (28.5g/L), por lo que puede emigrar fácilmente a medios acuosos y contaminarlos. Según la constante de Henry (1.31×10^{-2} atm.L/ mol) y la presión de vapor (2.9×10^{-3} atm), el compuesto tiene baja volatilidad (Tabla 1). De acuerdo con el coeficiente de partición octanol/agua, que es una medida de como una sustancia química puede distribuirse fácilmente en dos disolventes inmiscibles, como agua (solvente polar) y octanol (solvente relativamente no polar, que representa a las grasas), puede fijarse con firmeza a la materia orgánica, sedimentos y microorganismos (partes lipofílicas como membranas celulares).

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 a 20°C	1.31×10^{-2} atm L / mol
pKa a 25°C	8.48
Solubilidad del agua	28.5 g/L
Peso molecular	128.56
Presión de vapor a 20°C	2.9×10^{-3} atm

En comparación con otras clases de compuestos orgánicos, los clorofenoles muestran grados de toxicidad variable, dependiendo de la cantidad de cloros presentes en el anillo aromático. El 2-clorofenol y 3-clorofenol son considerablemente más tóxicos que los fenoles diclorados, pero menos tóxicos que el pentaclorofenol. El 2-CP es muy tóxico para la vida acuática a concentraciones de 2-7 mg/L (Annachhatre y col., 1996) y ha sido designado como uno de los contaminantes de alta prioridad por la EPA ya es que persistente y cancerígeno (ATSDR, 2003).

1.1. Métodos de eliminación de clorofenoles.

Existen procesos para eliminar los compuestos fenólicos halogenados; se incluyen los procesos fisicoquímicos (irradiación con luz, fotocátalisis y oxidación química) y biológicos (respiración aerobia y anaerobia). Sin embargo en el caso de los procesos fisicoquímicos se implican mayores costos en el tratamiento y pueden dar como productos compuestos más tóxicos que el 2-CP. (Mohn y Tiedje, 1992)

1.1.1 Procesos biológicos

Los clorofenoles pueden ser eliminados del medio ambiente por bacterias que realizan una biotransformación del compuesto, en donde la velocidad de biodegradación dependerá de la cantidad de microorganismos presentes y de las características del medio: pH, nivel de oxígeno, cantidad de nutrientes y temperatura, etc. (Cantar y col., 1991)

En condiciones aerobias, la ruta metabólica seguida por los compuestos clorofenólicos involucra primero una hidroxilación para formar los correspondientes clorocatecoles, seguida de la ruptura

del anillo en posición orto, que es catalizada por enzimas dioxigenasas. Posteriormente ocurre la pérdida espontánea de cloro durante el paso de lactonización, hasta finalmente producir CO_2 , H_2O y iones cloro, en otras palabras la mineralización completa del compuesto haloaromático. Sin embargo, en el caso del 2-CP puede existir inactivación de las dioxigenasas provocando la acumulación de intermediarios (Farrel y Brid., 1999).

En condiciones anaerobias, se ha encontrado que la vía de eliminación del 2-CP es la deshalogenación reductiva, provocando la formación del fenol como principal intermediario el cual tiene una toxicidad diez veces menor. El fenol también es difícil de degradar, pero la degradación se puede conseguir con mucha mayor facilidad que en el caso del 2-clorofenol. Posteriormente ocurre la formación de benzoato por medio de la carboxilación del fenol, y este compuesto es fácilmente metabolizable por digestión anaerobia a metano y dióxido de carbono (Basu y col. (1996), Haggblom y col. (1993)).

Debido que un proceso aerobio puede dar intermediarios más tóxicos que el propio 2-CP es entonces recomendable llevar a cabo la eliminación de este compuesto por medio de la digestión anaerobia.

1.1.2. Digestión anaerobia

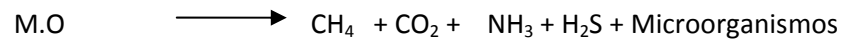
En los procesos biológicos, la materia orgánica contaminante es utilizada como sustrato por los microorganismos presentes en tanques y reactores. De esta forma pueden obtener energía necesaria para reproducirse y llevar a cabo sus funciones vitales. De tal forma que, los compuestos contaminantes son transformados en nuevas células y otros productos que pueden ser fácilmente separados del agua.

La principal división entre los diversos procesos biológicos existentes para el tratamiento de las aguas residuales, se hace en relación a la forma en que los microorganismos utilizan el oxígeno. Es así que se tienen los procesos aerobios (requieren oxígeno) y los anaerobios (no requieren oxígeno). Esto se traduce en sistemas muy diferentes entre sí, tanto en su microbiología, como en sus aplicaciones, su ingeniería y su control.

La digestión anaerobia, es un término que se refiere rigurosamente a las fermentaciones bacterianas anaerobias en las que biopolímeros orgánicos complejos y otros productos orgánicos

de desecho se descomponen produciendo una mezcla de metano y bióxido de carbono conocido como biogás (Colombs, 1992).

La digestión anaerobia es un proceso complejo que puede ser descrito en función de diversas variables interrelacionadas. Por definición, la digestión anaeróbica es “el uso de microorganismos, en ausencia de oxígeno, para la estabilización de materiales orgánicos mediante su conversión a metano y otros productos orgánicos incluyendo bióxido de carbono, como se muestra en la siguiente reacción:



Este proceso se utiliza en el tratamiento de aguas residuales, así como residuos de granjas, efluentes industriales o cultivos cuyo propósito es la obtención de energía.

Los tratamientos anaerobios ofrecen ventajas económicas atractivas, lo cual se fundamenta en la posibilidad de tratamientos de residuos con altas cargas en instalaciones relativamente compactas, la producción limitada de lodos, requerimientos nutricionales reducidos y un balance energético positivo. Este proceso, es controlado básicamente por las bacterias metanogénicas que presentaron un lento crecimiento y sensibilidad a cambios ambientales. Por consiguiente, todo diseño exitoso deberá estar basado en las características especiales limitantes de estos microorganismos.

1.1.3 Microbiología y bioquímica de la digestión anaerobia.

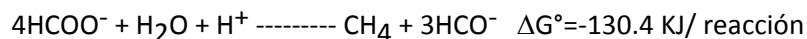
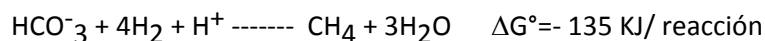
La degradación de un sustrato en un proceso anaerobio se consigue transformándola en compuestos inorgánicos en su mayoría volátiles: NH_3 , N_2 , H_2S y como compuestos orgánicos gaseoso CH_4 , CO_2 esto en ausencia de oxígeno molecular.

El proceso sigue una secuencia como la mostrada en la figura 1.1. En donde los biopolímeros de alto peso molecular, generalmente proteínas, carbohidratos y lípidos, son hidrolizados por medio de enzimas extracelulares a compuestos más simples y asimilables por las bacterias, como son azúcares, ácidos grasos, aminoácidos.

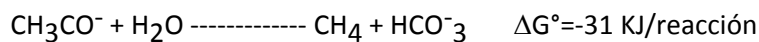
Los organismos fermentadores utilizan como sustrato a los azúcares y aminoácidos, mientras que los ácidos grasos son asimilados por los oxidadores anaerobios. Los productos de estas reacciones son acetato, hidrogeno, biomasa y productos intermediarios como el propionato y butirato. Estos últimos son degradados hasta acetato e hidrogeno por un grupo de bacterias conocidas como OHPA (las bacterias acidogénicas productoras obligas de hidrogeno, por sus siglas en ingles) las cuales deben existir en relación sintrófica con las metanogénicas que utilizan hidrógeno. Las bacterias metanogénicas utilizan un rango de sustratos muy limitado; H₂, CO₂, formiato, acetato, metanol, metilaminas, metildosulfuros.

De acuerdo a las reacciones metanogénicas podemos definir cuatro grupos nutricionales:

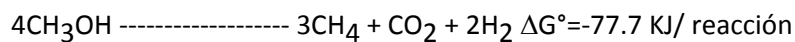
1) Bacterias hidrogeno tróficas. Son las bacterias que usan el H₂ + CO₂ y algunas especies el formiato para producir CH₄.



2) Bacterias acetoclásticas. Usan el acetato y algunas especies H₂ + CO₂, formiato, metanol, metilaminas y metildisulfuros, constituyen el 13% de la población total.



3).Bacterias metilotróficas. Usan el metanol y las metilaminas, constituyen el 27% de la población total



4) Bacterias alcoholotróficas. Usan CO₂ + alcohol (2-propanol, 2-butanol, etanol), constituyen solamente el 10% de la población.

Son seis los procesos de conversión identificados en la digestión anaerobia como se ve en la figura

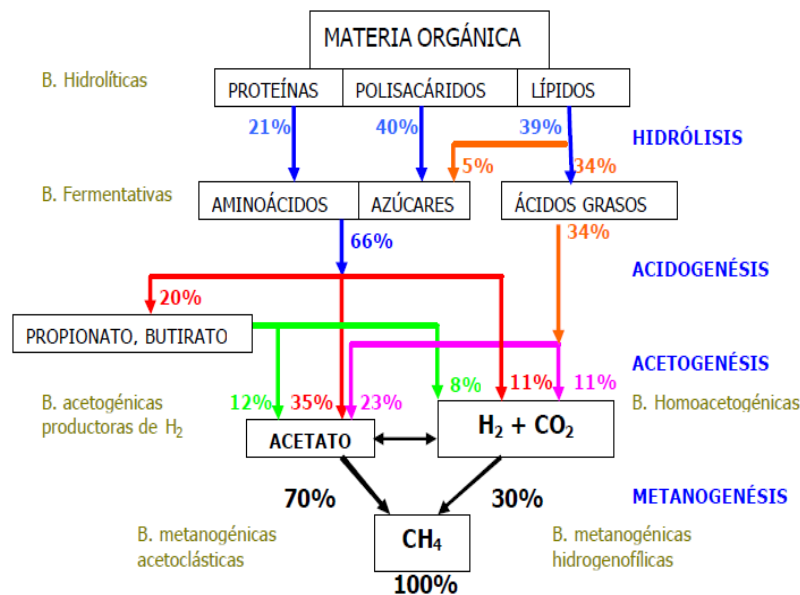


Figura 1.1 Esquema de la digestión anaerobia.

- 1.- Hidrólisis de biopolímeros (proteínas, carbohidratos y lípidos)
- 2.- Fermentación de aminoácidos y azúcares
- 3.- Oxidación β anaerobia de ácidos grasos de cadena larga y alcoholes
- 4.- Oxidación anaerobia de productos intermediarios, como ácidos volátiles (excepto acetato)
- 5.- Conversión de acetato a metano
- 6.- Conversión de hidrógeno a metano

Algunos detalles dentro del proceso que merecen atención es la dependencia de las bacterias OHPA, las cuales se pueden inhibir ante la existencia de presiones parciales elevadas de H_2 , existiendo una interrelación de dichos microorganismos con las bacterias metanogénicas hidrógenofílicas. En esta relación, llamada sintrófica, los microorganismos hidrogenofílicos se encargan de consumir el hidrógeno, manteniendo las concentraciones de dicho gas a niveles adecuados y así propiciar las condiciones necesarias para la producción de acetato e hidrógeno por las bacterias OHPA (Noyola, 1998b).

La digestión efectiva de la materia orgánica a metano requiere del metabolismo combinado y coordinado de diferentes tipos de bacterias anaerobias. Al menos cuatro grupos tróficos han sido aislados en digestores anaerobios, pudiendo ser diferenciados con base en los sustratos fermentados y a los productos formados.

Estos cuatro grupos son: bacterias hidrolíticas, bacterias acidogénicas, bacterias acetogénicas y metanogénicas.

1.1.4. Bacterias hidrolíticas

Las bacterias hidrolíticas, conforman una mezcla muy compleja de muchas especies bacterianas, la mayoría de las cuales son anaerobias obligadas (Cohen, 1982). No obstante, pueden resultar también numerosas algunas bacterias anaerobias facultativas tales como estreptococos y otros gérmenes entéricos.

Este tipo de microorganismos fermentan una gran variedad de moléculas orgánicas complejas como polisacáridos, lípidos y proteínas convirtiéndolos en una amplia gama de productos finales tales como ácido acético, mezclas de H_2 Y CO_2 compuestos mono carbonados, ácidos orgánicos de más de dos átomos de carbono de compuestos naturales tales como propanol, butanol, etc.

1.1.5. Bacterias acidógenas.

Las bacterias acidógenas, intervienen en los procesos de fermentación de aminoácidos y azúcares y en la oxidación anaerobia de ácidos grasos de cadena larga (Hense y col., 1983). La mayoría de las bacterias que conforman este grupo trófico son anaerobias, no obstante una pequeña fracción de este nivel es capaz de utilizar CO_2 (Souves, 1994) los productos metabólicos en esta etapa varían en dependencia de las condiciones aplicadas, el tipo de residentes de resistencia celular del tipo de sustrato y la rapidez de eliminación de hidrógeno del medio.

Los compuestos previamente hidrolizados son convertidos en ácidos orgánicos tales como; acético, propiónico y butírico, fundamentalmente (Joubert y col., 1987).

1.1.6. Bacterias acetogénicas.

Los productos metabólicos de las bacterias acidogénicas, son convertidos en sustratos para las bacterias acetogénicas hidrogenofílicas por la actividad de las bacterias acetógenas constituyentes del tercer nivel o grupo trófico en la secuencia poblacional que ocurre en la digestión anaerobia, siendo el resultado metabólico de este grupo, la formación de acetato, H_2 Y CO_2 . Estas bacterias participan tanto en las reacciones de oxidación anaerobia de productos, como las de conversión

no metanogèna de ácido acético, metanol e H_2 . En los digestores anaerobios se ha detectado que las bacterias acetògenas constituyen aproximadamente en 1 % de la población de metanogénicas hidrogenotrofas, teniendo como productos ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono.

1.1.7. ANTECEDENTES.

El término biodegradación se define como uso de microorganismos (hongos o bacterias) naturales o introducido, para degradar los agentes contaminantes (Pointing, 2001). Hasta hoy no ha sido evaluada extensamente la presencia de bacterias aerobias en lodos anaerobios, especialmente la contribución de éstas en la eliminación biológica de algunas moléculas recalcitrantes en ambientes supuestamente anòxicos (digestores anaerobios). Recientes trabajos se han enfocado en la posibilidad de que las bacterias aerobias estrictas, facultativas y anaerobias estrictas puedan coexistir en un ambiente único (Guyot, et al., 1995). Algunos microorganismos son capaces de adaptarse a la presencia de compuestos recalcitrantes para poder utilizarlos como cosustratos por ejemplo trabajando en la biodegradación de 2 –CP, el 3- Cloro-4-hidroxibenzoato; Xiaoming Zhang y colaboradores, 1992 observaron que la bacteria *Desulfomonile tiedjei* deshalógena este compuesto hasta 4 Hidroxibenzoato, otro intermediario de la ruta metabólica de 2 -CP

El metabolismo microbiano es probablemente el proceso más importante en suelos para la degradación de compuestos orgánicos persistentes (Zhang y Qiao, 2002), debido a que los microorganismos que los degradan, obtienen C, N o energía de las moléculas del contaminante para su consumo (Neilson *et al.*, 1990).

Diversos estudios han demostrado que las bacterias responsables de llevar a cabo la remoción del cloro (decoloración) al 2 –CP para formar fenol, están asociados con la actividad sintrófica de las bacterias acetogénicas (Basu y col., 1995; Kafkewitz y col., 1996), *Rhodococcus opacus* 1 cp` (Finkel'shtein y col., 2000), *Streptomyces rochei* 303 (Golovleva y col., 1992), *Alcaligenes* sp. A7-2 (Schwein y col., 1982; Menke y col., 1992), y *Alcaligenes xylosoxidans* JH1 (Hollender y col., 2000) han sido aislados en condiciones de aerobiosis para degradar 2 –CP. Se han logrado de aislar otros grupos bacterianos que degradan 2 CP en condiciones anaerobias, entre los que se encuentran *Disulfotobacterium* PCE1 (Gerritse y col., 1996), *Desulfotobacterium hafniense* TCP-A

Se ha encontrado que mediante procesos anaerobios se logra en algunos casos una mineralización y metanización de los compuestos aromáticos clorados, sin embargo, Basu y col. (1996), trabajando con 50 mg de 2-CP/L en un cultivo en lote con lodos anaerobios adaptados por 4 meses al 2-CP y utilizándolo como aceptor de electrones con diferentes donadores de electrones orgánicos (extracto de levadura, acetato, propionato) en diferentes atmosferas (N_2 , CO_2 , N_2/CO_2), encontraron que las mejores velocidades de consumo del 2-CP fueron con extracto de levadura como donador.

Hagglom y col. (1993), evaluaron la biodegradación anaerobia de 13 mg/L de 2-CP, 3-CP y 4-CP, con lodos adaptados acoplados con diferentes aceptores de electrones como nitrato sulfato y carbonato. El 2-CP fue consumido bajo las tres condiciones, sin embargo, el tiempo de consumo del 2-CP fue diferente, en cada caso se requirió un periodo de 106, 92 y menos de 30 días respectivamente y se encontró fenol como principal intermediario. En este estudio se cuantificó la producción de metano y se realizaron balances de masa para comprobar la mineralización del 2-CP.

Beristain y col. (2008) estudiaron la mineralización de 50 mg de 2-CP/L en condiciones metanogénicas en cultivos por lote, encontrando fenol como principal intermediario, de la deshalogenación y reportan que después de un periodo de aclimatación de 80 días la velocidad específica de consumo del 2-CP aumentó Usando acetato como donador de electrones, concluyen que el consumo de acetato se llevo a cabo de manera independiente al consumo de 2-CP; por lo que no fue necesaria la presencia de un donador para la metanogénesis de 2-CP.

2. JUSTIFICACIÓN

El 2-CP es un compuesto altamente tóxico por lo cual, es necesario encontrar condiciones para su eliminación. Dentro de los procesos biológicos el más recomendado es la digestión anaerobia, ya que el consumo de 2CP no genera intermediarios que resulten ser más tóxicos como ocurre en los procesos anaerobios y se produce biogás (CO_2 y CH_4) que puede ser utilizado como combustible.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar el consumo de 2-CP y fenol con lodos metanogénicos.

3.2. Objetivos específicos

Evaluar:

- Estandarizar las técnicas analíticas por CG y HPLC para el consumo de 2 CP, fenol metano y CO_2
- Mantener en régimen permanente el lodo metanogénico en un reactor UASB alimentado con glucosa o acetato.
- Estudiar el 2-CP y fenol en condiciones metanogénico con una atmósfera de nitrógeno.
- Evaluar la producción de biogás a partir de 2 CP y fenol en cinéticas por lote.

CAPÍTULO II

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Inóculo

Se utilizó un lodo granular procedente de una planta de tratamiento de agua residual de una industria cervecera (central de malta) en el estado de Puebla el cual contenía 25.7 g SSV/L. Cuando los lodos alcanzaron el estado estacionario metanogénico, estos fueron utilizados como inóculo para los ensayos cinéticos en lote.

Tabla 4. Condiciones iniciales de operación del reactor UASB

Condiciones de operación	Alimentación
Concentración de lodos SSV/L	25.7 g
Temperatura (°C)	35
pH	7
RTH(día)	1

4.2. Reactor UASB en estado estacionario

Como primera actividad es mantener el inóculo en condiciones metanogénicas y estado estacionario en un reactor UASB alimentado con glucosa 1g / L como fuente de carbono y medio mineral de Visser (Visser, *et al.*, 1995). Después en una segunda etapa se cambio por acetato de sodio para mejoramiento del reactor. El reactor UASB, fue elaborado con vidrio con un volumen de operación de 1400 ml y fue alimentado en continuo por medio de una bomba peristáltica. El reactor en continuo trabajó con las siguientes condiciones: TRH 1 día, temperatura de $32\pm0.5^{\circ}\text{C}$, pH de 7.0 En las tablas 4.1 y 4.2 se muestra la formulación del medio mineral.



Figura 4.1 Reactor UASB alimentado con glucosa

Tabla 4.1.- Composición del medio mineral Visser

Compuesto	Concentración g\L
NaH_2PO_4	0.703
NH_4Cl	0.028
MgSO_4	0.111
CaCl_2	0.1
NaCl	0.297
KCl	0.5
Elemento traza (ml)	1
Fuente de carbono(Glucosa)	1

Por separado se preparó una solución de elementos traza, de la cual se adicionó 1 mL por cada litro de medio. Que cada tres días se preparaban un volumen de 4 L.

Tabla 4.2.- Solución de elementos traza.

Componentes de solución	Concentración g/L
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.0786
Na_2SeO_3	0.1
H_3BO_3	0.05
ZnCl_2	0.05
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0.05
AlCl_3	0.05
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.05
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.07
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05
HCl 36% (Concentrado)	0.5 ml
$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2

4.2. Cinéticas en lote para la degradación de glucosa y fenol.

Preparación de las muestras. Las muestras fueron diseñadas de manera que cada botella solo correspondiera a una muestra de fenol y glucosa. Las cinéticas en lote se realizaron en botellas serológicas de 60 ml, que contenían 38 mL de medio Visser, 1mL de lodo metanogénico con una concentración de 25.7 g SSV/L, mas 1mL de fenol o de glucosa, los cuales contenían una concentración de 0.25 g/L, en cada caso, ajustando el pH a 7. Las botellas se sellaron con tapones de caucho y se les realizo intercambio de atmosfera con nitrógeno por 1 minuto. Después se incubaron en baño María a 35°C. De igual forma se prepararon las muestras control las cuales solo contenían 39 mL de medio Visser, 1 mL para observar la evolución de la cinética. El biogás producido encada botella fue cuantificado considerando su equivalencia con el volumen desplazado en botellas con solución salina a pH de 2 conectadas a las botellas. Esta actividad experimental se tuvo una duración de 4 días.



Figura 4.2. Diseño de las botellas serológicas para la cinéticas

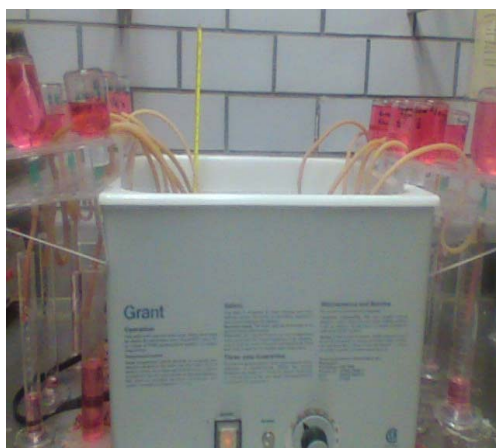


Figura 4.3. El baño maría donde están las cinéticas en las botellas serológicas

Cuantificación de parámetros fisicoquímicos. Para evaluar la biodegradabilidad se determinaron pH y demanda química de oxígeno (DQO) al inicio y final de cada una de las cinéticas y la producción y composición del biogás a lo largo del experimento.

4.3. Determinación del biogás

El volumen de biogás producido se mide por desplazamiento de una solución de NaCl (300 g/L) a pH de 2, (Figura 4.4) la composición del biogás, se analiza por cromatografía de gases

Utilizando un cromatógrafo Gow-Mac serie 550 con detector de conductividad térmica (TCD)

4.3. Cinéticas en lote para la degradación de 2-CP en diferentes concentraciones.

Las muestras fueron diseñadas de manera que cada botella solo correspondiera a una muestra de 2-CP, con una concentración (se realizó por triplicado), de las cuales fueron las siguientes: 31.25, 62.5, 125.0, 187.5, 250.0, 312.5 mg. Las cinéticas en lote se realizaron en botellas serológicas de 60 ml, que contenían 38 mL de medio Visser, 2 mL de lodo metanogénico con una concentración de 25.7 g SSV/L, mas 1µL de 2-CP, los cuales contenían una concentración de 31.25 mg/L, en cada caso, el cual fue variando dependiendo de cada una de las concentraciones que se iban realizando, donde ajustando el pH a 7. Tapando cada una de las botellas serológicas con parafilm, ya que el 2 CP es muy volátil. Las botellas

se sellaron con septo gris y se les realizo intercambio de atmosfera con nitrógeno por 1 minuto. Después se incubaron en una estufa a 35°C. De igual forma se prepararon las muestras de acetato las cuales solo contenían 38 mL de medio Visser, y 2 mL de lodo y agregando 0.5 ml de solución de acetato a concentración de 1 M Para observar la evolución de la cinética se realizan mediciones de biogás cada 2 horas en solución salina pero en tubos. Como muestra la figura (4.4). Esta actividad experimental se tuvo una duración de 350 horas.



Figura 4.4. Medición del biogás producido en las cinéticas

4.4. Cinéticas en lote para la degradación de 2-CP en diferentes concentraciones y cepa.

Las muestras fueron diseñadas de manera que cada botella solo correspondiera a una muestra de 2 -CP, con una concentración (se realizo por triplicado), de las cuales fueron las siguientes: 31.25, y otra con la misma concentración agregando una cepa, 62.5, 125.0, sin agregar nada, 250.0 y otra con la misma concentración agregando una cepa y la ultima 312.5 mg. Las cinéticas en lote se realizaron en botellas serológicas de 60 ml, que contenían 38 mL de medio Visser, 2 mL de lodo metanogénico con una concentración de 25.7 g SSV/L, mas 1 μ L de 2-CP, los cuales contenían una concentración de 31.25 mg/L, en cada caso, el cual fue variando dependiendo de cada una de las concentraciones que se iban realizando, donde ajustando el pH a 7. Tapando cada una de las

botellas serológicas con parafilm, ya que el 2 CP es muy volátil. Las botellas se sellaron con septo gris y se les realizó intercambio de atmósfera con nitrógeno por 1 minuto. De igual forma se prepararon las muestras control las cuales solo contenían 38 mL de medio Visser, 2 mL de lodo metanogénico para observar la evolución de la cinética. El biogás producido en cada botella fue cuantificado en el cromatógrafo Gow-Mac de esta cuantificación se obtiene el gráfico de CO_2 y CH_4 para cada caso donde se obtiene. Esta actividad experimental se tuvo una duración de 720 horas. (30 días)

5. TECNICAS DE ANALISIS.

5.1. Estandarización de Técnicas Analíticas

Para realizar la curva de calibración, se prepararon estándares de metano (CH_4) y dióxido de carbono (CO_2) en botellas serológicas de 60 mL, conteniendo 40 mL de medio Visser, la mezcla de gases ocupó 20 mL correspondiente al espacio de cabeza. Esta curva se realizó por triplicado en concentraciones de 0 a 100 mg /L de metano y 0 a 250 mg /L de dióxido de carbono (CO_2).

La cuantificación se hizo por cromatografía utilizando un cromatografo Gow-Mac, con una columna de acero empacada. Con las siguientes condiciones de análisis:

Detector: TCD (detector de conductividad térmica)

Temperatura de la columna: 140 °C

Temperatura del detector: 190 °C

Temperatura del inyector: 170 °C

Corriente en el detector: 120 mA

Gas acarreador: Helio

Flujo: 25 mL/min

Empaque de la columna: Carboxsphere 80/100, longitud 1.82 m, 3.2 mm ϕ .

Volumen de inyección: 0.1 mL.

5.2 Cuantificación de 2-CP y fenol.

Se realizaron una curvas patrón con 2-CP y fenol en concentraciones 0- 250 mg/L, como se muestran en la tabla 5.2 para conocer las concentraciones reales de la muestra, donde se obtuvo la ecuación de la recta (Fig. w)

La solución patrón de 2 CP fue de 250 mg/ L, la cual se aplicó en volúmenes diferentes para las distintas concentraciones. Para cada concentración en la botella serológica con un volumen de 60 ml y de los cuales solo 40 ml contenía medio Visser.

Se graficó el promedio de cada una de las áreas contra la respectiva concentración de donde se obtiene la ecuación lineal de la recta así como su coeficiente R^2 (esta se muestra en la parte de resultados)

La solución patrón de fenol fue de 150 mg/ L, la cual se preparo disolviendo 0.05 g de fenol en un matraz de 100 ml, aforando con agua destilada.

2-CP(solución patrón μL)	Concentración (mg/L)	Volumen (mL) solución patrón de fenol	Concentración (mg/L)	Volumen de medio Visser(mL)
0	0	0	0	0
1.6	25	1	25	39
3.2	50	2	50	38
4.76	75	3	75	37
6.4	100	4	100	36
8	125	5	125	35

Tabla 5.1.1. Elaboración de las curvas patrón de 2-CP y fenol.

A partir de las soluciones patrón, se realizaron diluciones con agua destilada para tener intervalos de concentraciones de 0 a 125 mg/L, como se muestra en la tabla 5.1.1. En éstas se llevo a cabo un cambio de atmosfera de metano (CH_4) y CO_2 en diferentes concentraciones. En esta actividad experimental se realizo por triplicado y se preparo a partir de una solución madre de fenol.

Utilizando la siguiente fórmula $C_1V_1 = C_2 V_2$

Se grafico el promedio de cada una de las absorbancia contra la respectiva concentración de donde se obtiene la ecuación lineal de la recta así como su coeficiente R^2

Para la determinación se tomó 0.1 mL de biogás en fase gas, directamente de las botellas serológicas que contenían 2 CP a una concentración de 250 mg/L y fenol a 150 mg/L

Se grafico el promedio de cada una de las áreas contra la respectiva concentración de donde se obtiene la ecuación lineal de la recta así como su coeficiente R^2

5.3. Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO) total y soluble.

La DQO es usada como una medida del contenido de oxígeno equivalente necesario para la oxidación de la materia orgánica de una muestra que es susceptible a ser oxidada por un oxidante químico fuerte.

La DQO total y soluble se determinaron por reflujo cerrado de acuerdo con los Standard Methods, APHA, AWWA, WPFC (1995). Se utilizó el procedimiento descrito por Hach, utilizando 2mL. Para la realización de esta técnica primeramente se prepararon dos soluciones

1.- Solución Digestora.

Se seca durante dos horas a 103°C , 50 g de dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) se enfrían posteriormente en un desecador y se pesan 2.25g. A continuación se pesan 33.3g de HgSO_4 . En un matraz aforado, se disuelven el dicromato de potasio en 500 mL de agua destilada. Se añade el sulfato de mercurio. Adicionando en baño de hielo y muy lentamente 167 mL de H_2SO_4 puro. Cuando la mezcla se enfría se disuelve lentamente y se afora a un litro de agua destilada.

2.- Solución de ácido sulfúrico puro con sulfato de plata.

Se pesa suficiente sulfato de plata para una proporción de 5.5g AgSO_4 / Kg de H_2SO_4 . Para calcular la cantidad exacta se considera el peso específico y la pureza del ácido sulfúrico. En un matraz aforado de 1L, se agregan 300 mL de ácido y 26.03g de sulfato de plata. Se deja en reposo durante un día para que se disuelva.

Para llevar a cabo la determinación de la concentración de materia orgánica expresada como en DQO se realizó una curva estándar o patrón elaborada a partir de una solución madre de glucosa en una concentración de 1000 mg/L como se muestra en la tabla 5.1.1

En un tubo HACH con tapa de rosca se agregaron 2.0 mL de la muestra a analizar, en otro tubo se agregan 2.0 mL de agua destilada (para el blanco), se le añade 1 mL de la solución digestora, se adiciona lentamente 2 mL de la solución de ácido con plata, se tapan los tubos y se homogenizan la muestra agitando suavemente. Se colocan los tubos en una parrilla para la digestión durante 2 horas a una temperatura de 150°C . Posteriormente, una vez fríos se leen en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 620 nm, ajustando a cero con el blanco.

La solución patrón de glucosa fue de 1000 mg/ L, la cual se prepara disolviendo 100 mg de glucosa en un matraz de 100 ml.

A partir de las soluciones patrón, se realizaron diluciones con agua destilada para tener intervalos de concentraciones de 0 a 1000 mg/L, como se muestra en la tabla 5.1.2.

Utilizando la siguiente fórmula $C_1V_1 = C_2 V_2$

Tabla 5.1.2.-Preparación de la curva patrón de DQO.

Volumen total (mL)	Concentración (mg/L)	Volumen (mL) de solución patrón 1000 mg/L	Volumen de H ₂ O (mL)
2	0	0	2
2	200	0.4	1.6
2	400	0.8	1.2
2	600	1.2	0.8
2	800	1.6	0.4
2	1000	2	0

Las muestras se realizaron por triplicado con un volumen total de 2000 μ L, las cuales se colocaron en los tubos HACH y se le agrego las dos soluciones para la realización de la digestión siguiendo el procedimiento anteriormente mencionado. La lectura de la absorbancia se midió a una longitud de onda de 620 nm en un espectrofotómetro SPECTRONIC INSTRUMENTO modelo 20 D+

5.4. Determinación de sólidos suspendidos volátiles.

Los sólidos suspendidos volátiles se indican como un índice de la concentración de biomasa. Se determinaron los sólidos suspendidos totales (SST) que son los sólidos totales que presenta la muestra, los sólidos fijos (SF) son los sólidos que pertenecen a compuestos inorgánicos y los sólidos volátiles (SV) son sólidos correspondientes a biomasa así como compuestos biodegradables presentes en los lixiviados orgánicos e inorgánicos, por la técnica gravimétrica.

Se colocaron papeles filtro en una estufa a una temperatura de 105 °C hasta obtener un peso constante (3 pesos a 105°C por dos horas). Se filtraron 10 mL de lodo y se procedió a colocar los papeles en la estufa a 105 °C durante 2 horas, al enfriarse en un desecador se registró el peso (sólidos secos). Posteriormente, se colocaron el papel filtro con el lodo en una mufla a 550°C por 20 minutos. Al enfriarse se registró el peso nuevamente (sólidos fijos). La diferencia entre sólidos totales y fijos son los sólidos suspendidos volátiles

La concentración de sólidos suspendidos totales (g SST/L), se calcula de la forma siguiente:

$$g \text{ SST/ L} = (B-A)/V$$

Donde A= Peso de papel filtro (g)

B= Peso de papel filtro + residuo (g), 110°C

V= volumen de la muestra (L)

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

$$g \text{ SSF/L} = (C-A)/V$$

Donde A= Peso de papel filtro (g)

B= Peso de papel filtro + residuo (g), 550°C

V= volumen de la muestra (L)

Obteniendo la diferencia se tiene a los sólidos suspendidos volátiles (ssv)

$$g \text{ (ssv)/L} = \text{SST-SSF}$$

Dando por resultado de 25.7g/L

5.5. Determinacion de pH

El pH, se determinó mediante un potenciómetro, corning pH/ ion Analyzer 455, con un electrodo Conductronic, a 25.5 °C. De acuerdo a los pasos siguientes:

- a) Colectar en un vaso de precipitado 20 mL de muestra.
- b) Verificar que el potenciómetro se encuentre calibrado.
- c) Agitar la muestra utilizando un agitador magnético hasta homogeneizar completamente.
- d) Verificar que la temperatura de la muestra sea aproximadamente de 25°C, ajustar en un baño de agua si es necesario.
- e) Sacar el electrodo de la disolución de reposo en que normalmente se encuentra,
Enjuagarlo con agua destilada, secarlo cuidadosamente solo para eliminar el exceso de
La disolución de enjuague, cuidando de no friccionar el bulbo.
- f) Proceder a realizar la medición de pH de la muestra, la lectura aparecerá en pantalla.
Al terminar la medición, el electrodo debe enjuagarse con agua destilada hasta eliminar
Cualquier posible residuo de la disolución de prueba, y almacenarlo en la disolución de
Reposo.

CAPÍTULO III

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Mantenimiento del reactor UASB

El reactor se operó con el propósito, de obtener el lodo metanogénico alimentando con glucosa, el cual presento una etapa de arranque muy inestable. La cuál se observa en la primera etapa. El incremento de remoción de la DQO fue paulatino hasta donde se observa 1 día a 100 días una etapa de adaptación en el reactor con una eficiencia de remoción de DQO baja. Se inicio con un TRH de 1 día. A partir del día 120 y hasta el día 260 se presenta un estado estacionario del reactor, sin embargo la eficiencia de remoción fue solamente de 49.9 %, siendo muy baja debido probablemente a que el RTH de 1 día no fue suficiente para que los AGV provenientes de la fermentación de la glucosa se convertirán a acetato y esta a su vez fuera convertida en metano y CO₂ por las bacterias metanogénicas. Esto puede explicarse a que se encontró en el efluente del reactor una concentración de acetato residual de 206 mg / L que no puede ser convertido a metano.

La literatura menciona que las bacterias metonogénicas tienen tiempos de duplicación muy grandes (días) por lo que puede haberse requerido de un TRH mayor para que estas bacterias transforman toda la glucosa en metano.

En esta etapa se realiza una cinética de fenol y glucosa con un tiempo de duración de 7 dias. Donde los parámetros que se evaluaron fueron el pH, SSV, DQOi y DQOf, biogás (CH₄ Y CO₂) con mediciones de cada hora. A continuación se muestra el grafico de DQO del reactor en su etapa de arranque y en los primeros tres meses.

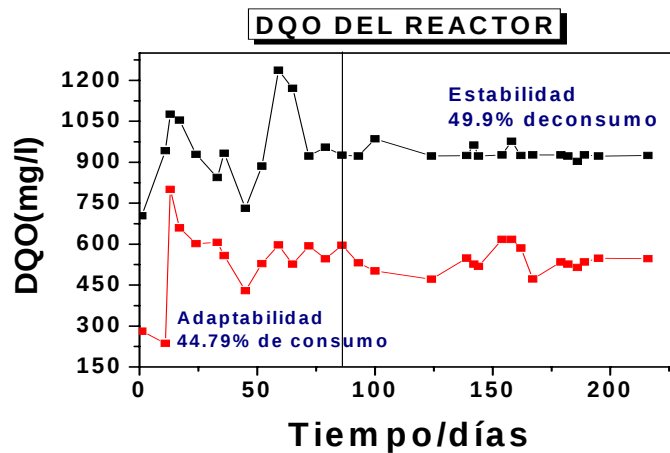


Figura 6.4.-Remoción DQO del reactor UASB alimentado con glucosa.

6.1.2 Evolución del pH

El pH es una de las variables utilizadas en el diagnóstico de los sistemas anaerobios. Para que el proceso se desarrolle satisfactoriamente el pH no debe bajar de 6 ni subir de 8. La figura 6.- muestra el pH en el reactor USB. Una de las consecuencias de que se produzca un descenso del pH a valores inferiores a 6 es que el biogás generado es muy pobre en metano.

En los primeros 100 días de operación el pH estuvo alrededor de 6.5 y después empezó a subir hasta el valor consigna de 7.2 (ver figura), fluctuando entre 6.5 y 7.2 a partir de los 300 días y hasta la última medición.

De los resultados de esta actividad se observó que el pH, fue favorable para llevarse a cabo la metalogénesis.

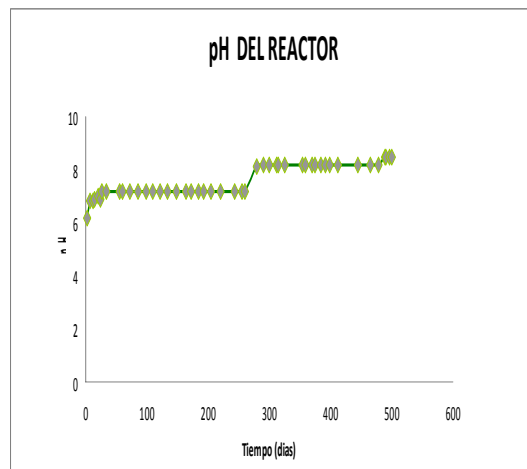


Figura 6.- Evolucion de pH en un reactor UASB

6.1.3 Remoción de DQO.

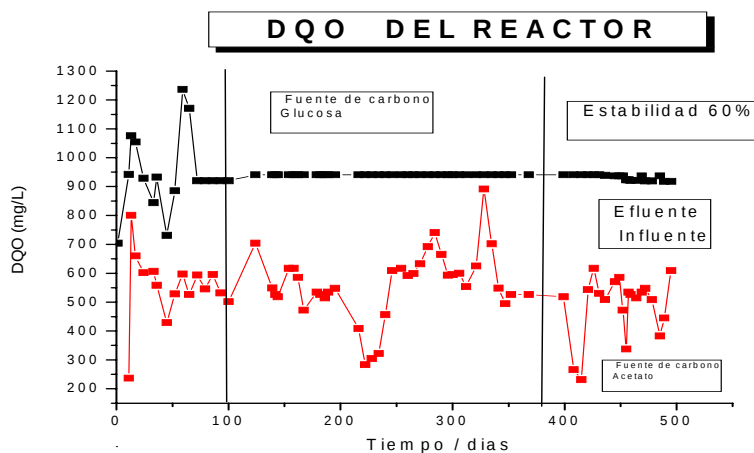


Figura 6.1.-Remoción DQO del reactor UASB alimentado con acetato.

La baja eficiencia en la remoción de DQO pudo ser debida, a que las bacterias metanogénicas tienen una tasa de crecimiento muy grande es que son metanogénicas estrictas. Por este motivo se decidió cambiar de fuente carbono y hacerlo con acetato para tener mejoría en el reactor. Esto se presenta en el grafico de QDO como una segunda etapa. El diseño de las cinéticas se observa en los 300 días

6.3.4. RESULTADOS DE LAS CINÉTICAS EN LOTE.

Las cinéticas se realizaron en un tiempo de 168 horas en donde se tomaron mediciones cada hora, las mediciones arrojaron los siguientes datos para cada compuesto:

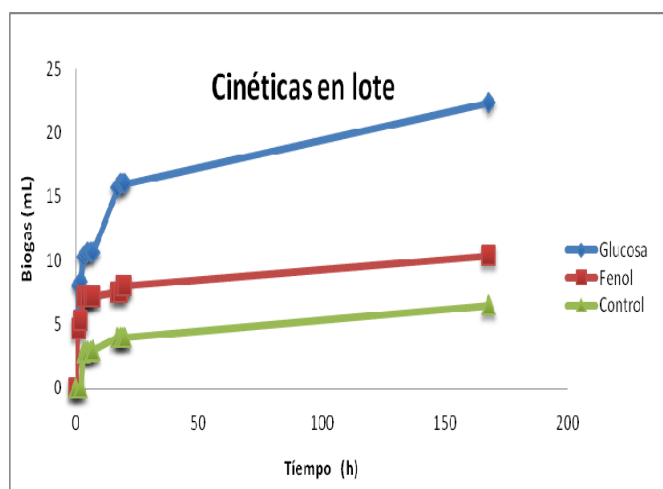


Figura 6.2.- Produccion de biogàs de las cinéticas en lote.

Tabla 6.3.1.-Comportamiento de DQO y pH inicial y final de cada una de las cinéticas en lote

Conc(mg/L)	pH inicial	pH final	DQO(mg/L inicial)	DQO(mg/L final)	DQO(mg/L removida)	Eficiencia (%)
Glucosa 250	7.3	6.67	623.8	291.1	332.7	53.3
Fenol 250	7.2	6.9	811.5	598.6	212.9	26.2
Control	7	6.8	29.9	26.5	3.4	11.3

En el caso de las muestras, la producción de metano no fue significativa y por lo tanto los valores de la actividad son muy bajos, debido probablemente a que las características del lodo

del reactor UASB. La eficiencia de remoción de glucosa y fenol, cuando el lodo se alimentó con glucosa fueron de 53.3 % y 26.2% respectivamente. Es que el lodo no estuvo expuesto anteriormente a periodos de aclimatación con el fenol por tal motivo se reduce en un 50 % por ser un lodo sin aclimatación. La siguiente cinética se realizó en un tiempo de 50 horas en donde se tomaron mediciones cada hora, las mediciones arrojaron los siguientes datos para cada compuesto de fenol, 2 CP y control para obtener la evolución de la cinética.

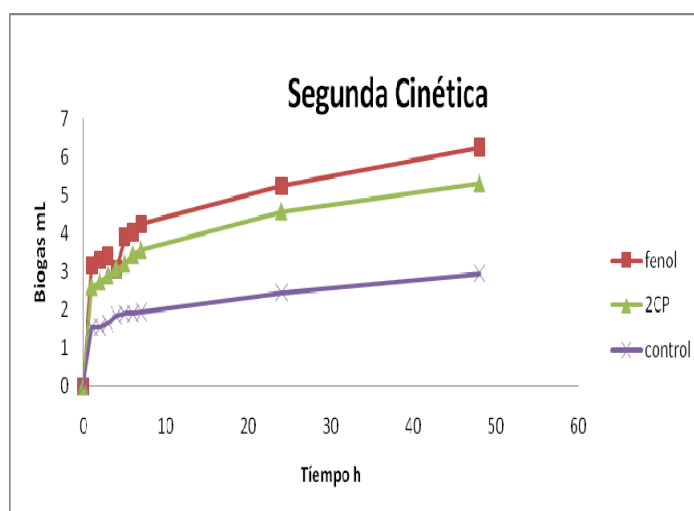


Figura 6.3.- Producción de biogás de la segunda cinética en lote

Tabla 6.3.2.-Comportamiento de DQO y pH inicial y final de cada una de las cinéticas en lote

	pH inicial	pH final	DQO(mg/L inicial)	DQO(mg/L final)	DQO(mg/L removida)	Biogas (mL)
Fenol	7.1	7.4	2857.14	1122.44	1734.69	7
2 CP	7.11	7.8	5234,69	1367.34	3867.34	5
Acetato	7.14	7.6	3163,26	2336.73	826.53	

En el caso de las muestras, la producción de metano no fue significativa y por lo tanto los valores de la actividad son muy bajos, debido probablemente a que las características del lodo del reactor UASB.

6.3.5. Datos de la tercera cinética.

Las cinéticas se realizaron en un tiempo de 350 horas en donde se tomaron mediciones cada hora, las mediciones arrojaron los siguientes datos para cada concentración de 2CP

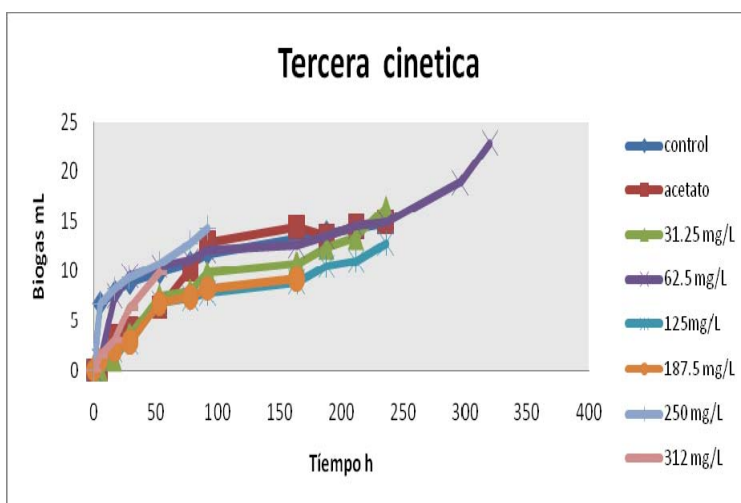


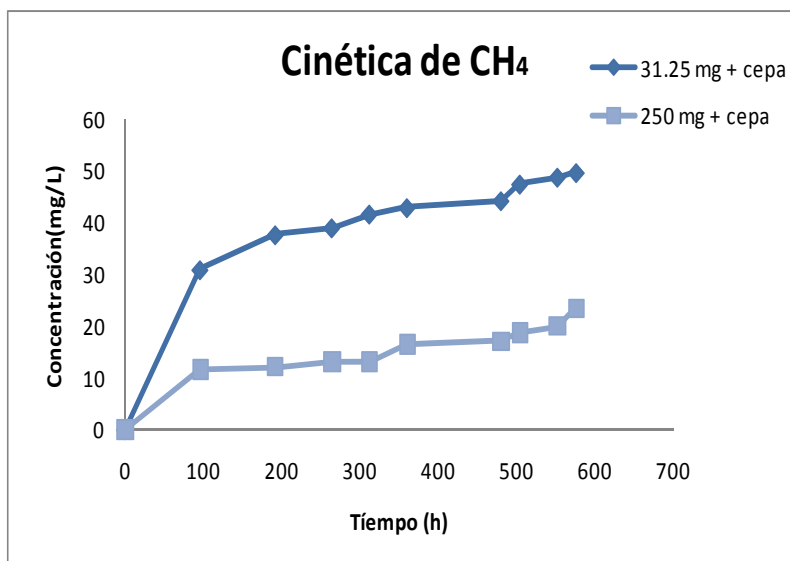
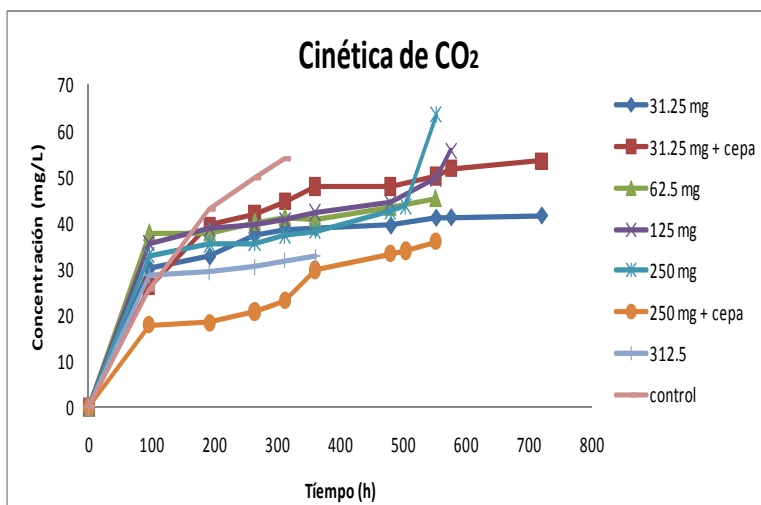
Figura 6.4.- Producción de biogás de la tercera cinética en lote

Tabla 6.3.3.-Comportamiento de DQO y pH inicial y final de cada una de las cinéticas en lote

Concentración 2 CP(mg/L)	pH inicial	pH final	DQO(mg/L inicial)	DQO(mg/L final)	DQO(mg/L) removida	Eficiencia (%)
31.25	7.0	6.35	162.24	37.75	124.48	76.72
62.5	7.0	6.40	141.83	112.24	29.59	20.86
125	7.0	6.34	200	166.32	33.67	16.83
187.5	7.0	6.28	416.32	223.46	192.85	46.32
250	7.0	6.35	581.63	263.26	318.36	54.73
312.5	7.0	6.45	689.79	421.42	268.36	63.68

En el caso de las muestras, la producción de metano no fue significativa y por lo tanto los valores de la actividad son muy bajos, debido probablemente a que las características del lodo del reactor UASB.

6.3.6. Datos de la cuarta cinética.



Concentración 2 CP(mg/L)	pH inicial	pH final	DQO(mg/L inicial)	DQO(mg/L final)	DQO(mg/L) removida	Eficiencia (%)
31.25	7.5	7.4	16.32	5.10	11.22	68.75
31.25 + cepa	7.4	7.8	110.20	35.71	74.48	67.59
62.5	7.4	7.6	48.97	26.53	22.44	45.83
125	7.4	7.6	156.12	128.57	27.55	17.64
250	7.5	8.1	162.24	220.40	58.16	35.84
250 + cepa	7.6	8.4	438.77	211.22	227.55	51.86
312.5	7.5	8.3	264.28	165.30	98.97	37.45

6.4. Curvas estándar para la cuantificación de las diferentes variables.

El promedio de los datos obtenidos en la curva patrón de glucosa correspondientes a las absorbancia para cada concentración. Se grafico la absorbancia en función de la concentración Figura 6. De la cual se obtuvo por regresión lineal la ecuación de la recta y el coeficiente R^2 . Esta ecuación se utilizo durante todo este trabajo para calcular las concentraciones de DQO en las diferentes pruebas.

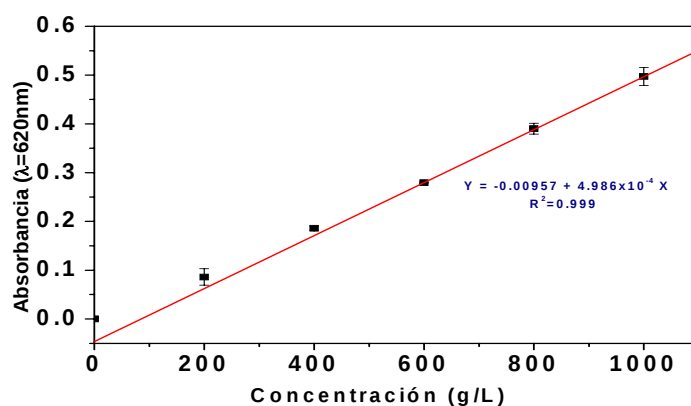


Figura 6.5.- Curva estándar para la cuantificación de DQO

Determinación de (CH₄ Y CO₂) por cromatografía de gases (TCD)

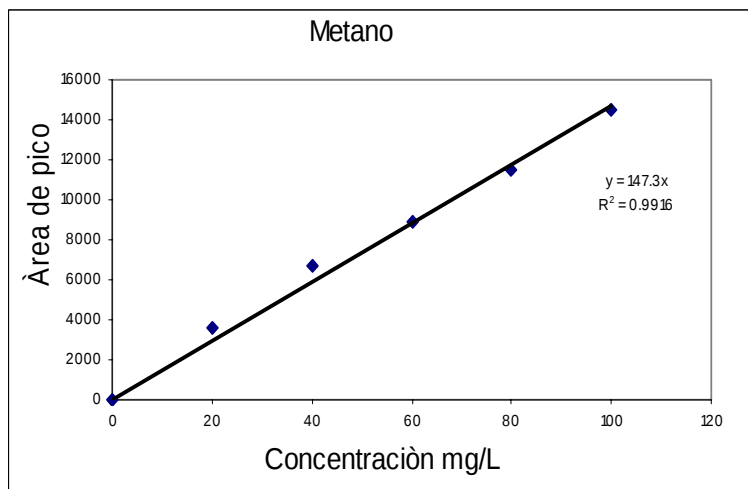


Figura 6.6.-Curva estàndar de metano por CG-TCD

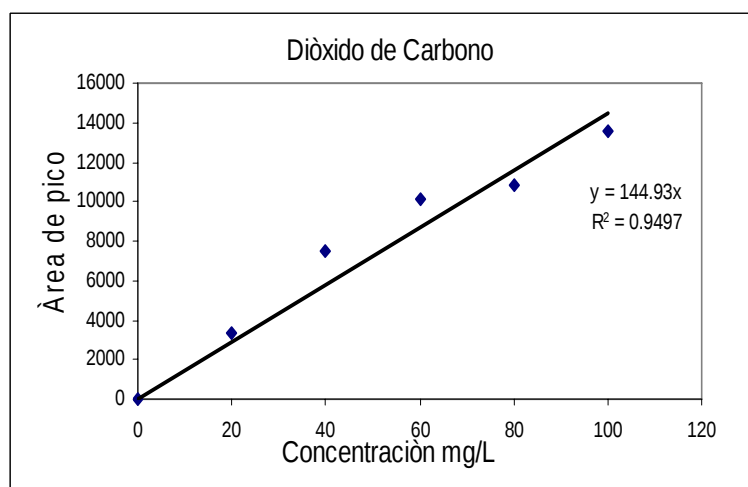


Figura 6.7.- Curva estàndar de CO₂ por CG-TCD

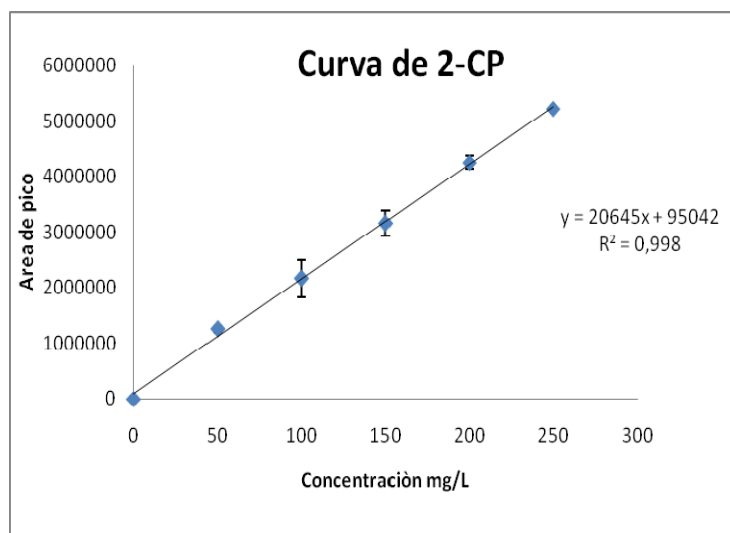


Figura 6.8.- Curva estàndar de 2-Cp por HPLC

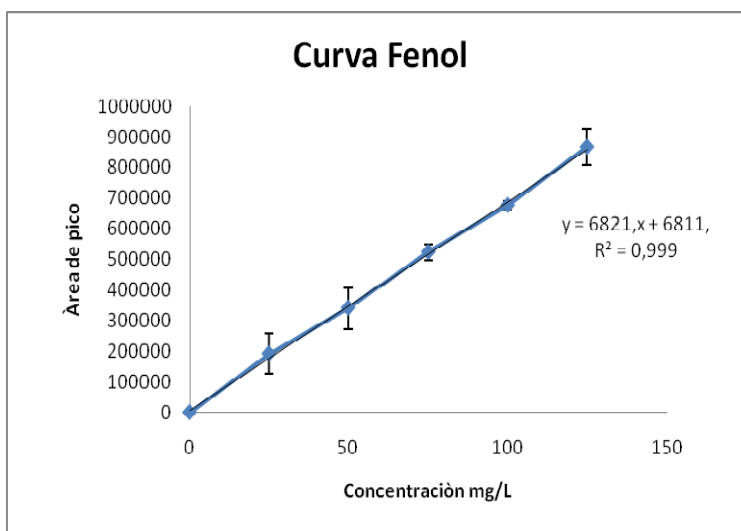


Figura 6.9.- Curva estàndar de fenol por HPLC

Tabla 6.3.4.- Ecuaciones y coeficientes R2 para cada recta en la curva estándar

Compuesto	Ecuación	R2
Fenol	$Y=6821 X + 6811$	0.999
2-CP	$Y=20645 X + 95042$	0.998
CH ₄	$Y=0.183 X - 0.085$	0.998
CO ₂	$Y=0.141 X + 0.334$	0.997
DQO	$Y=0.0095 X + 0.00049$	0.999

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

La estandarización de las técnicas analíticas mostró una buena linealización con un coeficiente de correlación muy cercano a uno.

El reactor se mantiene en estado estacionario con una eficiencia de remoción de la fuente de carbono de 50%

La eficiencia de remoción de DQO en las cinéticas en lote (53.3 % Glucosa y 26.2% de fenol), muestran un efecto negativo del fenol hacia los lodos metanogénicos.

Las cinéticas en lote mostraron que el fenol es un compuesto recalcitrante, mientras que la glucosa fue altamente degradable. La baja eficiencia en la remoción de QDO en el reactor puede deberse al TRH de un día, ya que el efluente contenía una concentración de AGV residual de 260 mg/L.

Las baterías anaerobias son muy sensibles a las condiciones fisicoquímicas de su medio ambiente (pH, temperatura) y a cambios de en la composición del medio (sustancias tóxicas, pérdida de nutrientes) cualquier alteración en el medio ambiente origina en un sistema cuya respuesta de adaptación puede ser tan lenta que se mantenga la actividad biológica del reactor muy lenta e incluso se llegue a dar un paro total del reactor.

BIBLIOGRAFÍA

1. Annachhatre A.P y Gheewala S.H (1996). Biodegradation of chlorinated phenolic compounds. *Biotechnol. Adv.* 14: 35-56
2. 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>>.
3. APHA. (1995). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (19th edn). American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington, DC.
4. Beristain L., Cuervo-Lopez F. y Ramirez-Vives F. (2008) Mineralización y metanización del 2-Clorofenol. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana
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. Farrel A. y Brid Q. (1999). Degradation of mono-chlorophenols by mixed microbial community via a *meta*-cleavage pathway, *Biodegradation*, **10**:353-362.
7. 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.