

IPICYT

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**Aplicación del óxido grafeno como mediador redox, en la
reducción de contaminantes por un consorcio anaerobio,
bajo condiciones metanogénicas y sulfato-reductoras**

Tesis que presenta

Alejandra Colunga Álvarez

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Ambientales

Director de la Tesis:

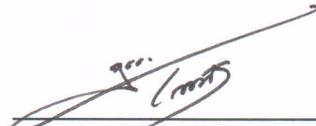
Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo

San Luis Potosí, S.L.P., Septiembre de 2014

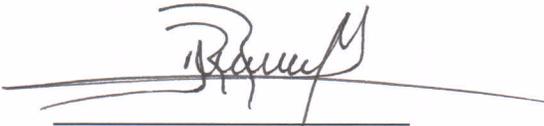


Constancia de aprobación de la tesis

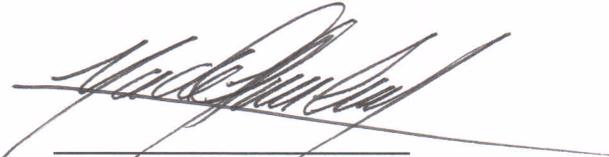
La tesis "*Aplicación del óxido grafeno como mediador redox, en la reducción de contaminantes por un consorcio anaerobio, bajo condiciones metanogénicas y sulfato-reductoras*" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Alejandra Colunga Álvarez** y aprobada el **diez de septiembre del dos mil catorce** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo
Director de la tesis



Dr. José René Rangel Méndez
Miembro del Comité Tutorial



Dra. María de Lourdes Berenice Celis García
Miembro del Comité Tutorial

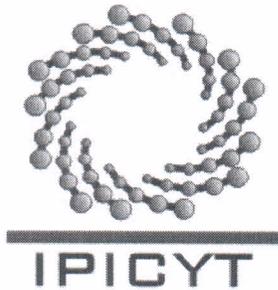
Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (282470) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Este trabajo de investigación fue financiado por CONACyT Ciencia Básica (SEP-CONACYT 155656).

Al Comité de Becas del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C., por los recursos financieros otorgados para la divulgación de parte de los resultados de esta investigación en un congreso nacional.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 015 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 10 días del mes de septiembre del año 2014, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. José René Rangel Méndez	Presidente	IPICYT
Dra. María de Lourdes Berenice Celis García	Secretaria	IPICYT
Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

sustentó la C.

Alejandra Colunga Álvarez

sobre la Tesis intitulada:

Aplicación del óxido grafeno como mediador redox, en la reducción de contaminantes por un consorcio anaerobio, bajo condiciones metanogénicas y sulfato-reductoras

que se desarrolló bajo la dirección de

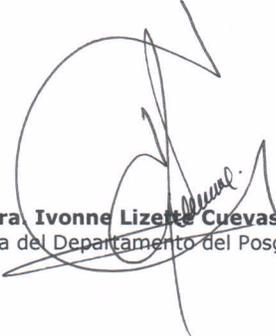
Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo

El Jurado, después de deliberar, determinó

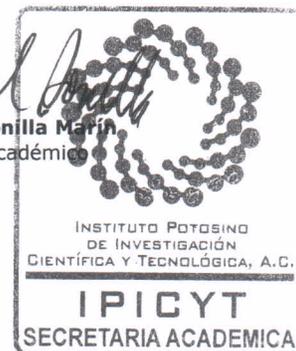
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 17:50 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 10 días del mes de septiembre de 2014.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



*Dedicado a mi papo, mamo y mi
hermana, mi mas grande
inspiración y ejemplo.*

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Francisco Cervantes por brindarme la oportunidad de desarrollar este proyecto, por su ayuda, sus enseñanzas, paciencia, confianza y ejemplo de sencillez.

Agradezco al Dr. René Rangel por haberme permitido incorporarme a su grupo de trabajo, por su apoyo, confianza y ejemplo de trabajo duro.

Agradezco a la Dra. Berenice Celis por su gran disposición para asesorarme y por sus valiosas aportaciones al proyecto.

Agradezco a los investigadores del área Ambiental por los conocimientos que me compartieron durante la maestría y que ayudaron a mi formación.

Agradezco al M. en C Juan Pablo Rodas y M. en C. Guillermo Vídriales Escobar y muy especialmente a la M en C. Dulce Partida por su trato amable, gran disposición, ayuda y apoyo técnico en los laboratorios.

Agradezco a I.Q. Ma del Carmen Rocha Medina y a la Dra. Mireya Edith Martínez Pérez por su indispensable ayuda durante el análisis de muestras en el laboratorio.

Agradezco a Ivonne y Edith por todo el apoyo y disposición brindada en asuntos administrativos.

Agradezco a mis compañeros y amigos de generación, del grupo de adsorción y del grupo del Dr. Cervantes por sus consejos, apoyo y conocimientos a lo largo de mi estancia en el IPICyT.

Agradezco a mis padres, hermana y Enrique por el gran apoyo incondicional a lo largo de toda mi maestría.

Contenido

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS	ii
CRÉDITOS INSTITUCIONALES	iii
ACTA DE EXAMEN	iv
DEDICATORIAS	v
AGRADECIMIENTOS	vi
LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- MARCO TEÓRICO	5
2.1.- CONTAMINANTES	5
2.1.1.- COLORANTES AZO	5
2.1.2.- COMPUESTOS NITROAROMÁTICOS	6
2.2.- EFECTOS A LA SALUD Y MEDIO AMBIENTE	7
2.2.1.- COLORANTES AZO	7
2.2.2.- COMPUESTOS NITROAROMÁTICOS	7
2.3.- TÉCNICAS PARA TRATAMIENTO DE EFLUENTES CONTAMINADOS CON COMPUESTOS NITROAROMÁTICOS Y COLORANTES AZO	8
2.4.- DEGRADACIÓN ANAEROBIA	9
2.4.1.- REDUCCIÓN DE COLORANTES AZO BAJO CONDICIONES ANAEROBIAS	10
2.4.2.- REDUCCIÓN DE COMPUESTOS NITROAROMÁTICOS BAJO CONDICIONES ANAEROBIAS	11
2.5.- MEDIADORES REDOX EN PROCESOS REDUCTIVOS DE CONTAMINANTES	13
2.5.1.- MATERIALES A BASE DE CARBONO COMO MEDIADORES REDOX	15
2.5.2.- ÓXIDO DE GRAFENO COMO MEDIADOR REDOX	16
3.- JUSTIFICACIÓN	20
4.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	21
4.1.- HIPÓTESIS	21
4.2.- OBJETIVO GENERAL	21
4.2.1.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
5.- MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1.- MATERIALES	22
5.1.1.- ÓXIDO DE GRAFENO	22
5.1.2.- ROJO REACTIVO 2	22
5.1.3.- 3-CLORONITROBENCENO	22
5.1.4.- 3-CLOROANILINA	22

5.1.5.-	ANILINA	22
5.1.6.-	ENRIQUECIMIENTO DE BIOMASA METANOGENICA Y SULFATO-REDUCTORA	23
5.2.-	SOLUCIONES	23
5.2.1.-	MEDIO BASAL	23
5.2.2.-	BUFFER DE FOSFATOS	23
5.3.-	MÉTODOS	24
5.3.1.-	DETECCIÓN DE GRUPOS FUNCIONALES POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE FOURIER	24
5.3.2.-	DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA	24
5.3.3.-	DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL Z	
5.3.4.-	TITULACIONES BOEHM	24
5.3.5.-	DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL ÓXIDO-REDUCCIÓN	25
5.3.6.-	REDUCCIÓN QUÍMICA DEL ROJO REACTIVO 2 Y DEL 3-CLORONITROBENCENO CON Na ₂ S COMO AGENTE REDUCTOR	26
5.3.7.-	REDUCCIÓN BIOLÓGICA DEL ROJO REACTIVO 2 Y DEL 3-CLORONITROBENCENO EN UN AMBIENTE METANOGENICO Y SULFATO-REDUCTOR	27
5.3.8.-	DETERMINACIÓN DE METANO	29
5.3.9.-	DETERMINACIÓN DE LA DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO	29
5.3.10.-	CUANTIFICACIÓN DE SULFATO	30
5.3.11.-	CUANTIFICACIÓN DE SULFURO DISUELTO	30
5.3.12.-	MEDICIÓN DE pH	30
5.3.13.-	CUANTIFICACIÓN DE ANILINA	30
5.3.14.-	CUANTIFICACIÓN DE 3-CLOROANILINA	31
5.3.15.-	DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE PRIMER ORDEN	32
6.-	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
6.1.-	CARACTERIZACIÓN DEL ÓXIDO DE GRAFENO	33
6.1.1.-	GRUPOS FUNCIONALES	33
6.1.2.-	CARGA SUPERFICIAL DEL MATERIAL	35
6.1.3.-	EFECTO DE TAMAÑO DE PARTÍCULA	37
6.1.4.-	POTENCIAL ÓXIDO REDUCCIÓN (ORP) DEL ÓXIDO DE GRAFENO	38
6.2.-	EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ÓXIDO DE GRAFENO EN LA REDUCCIÓN DEL RR2 Y 3CNB	39
6.3.-	TOXICIDAD DEL ÓXIDO DE GRAFENO SOBRE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS	44
6.4.-	EXPERIMENTOS DE REDUCCIÓN	45
6.4.1.-	REDUCCIÓN DEL COLORANTE ROJO REACTIVO 2	45
6.4.1.1.-	REDUCCIÓN QUÍMICA	45
6.4.1.2.-	REDUCCIÓN BIOLÓGICA	47

6.4.2.-	REDUCCIÓN DEL 3-CLORNITROBENCENO	53
6.4.2.1-	REDUCCIÓN QUÍMICA	53
6.4.2.2.-	REDUCCIÓN BIOLÓGICA	55
7.-	CONCLUSIONES	60
8.-	PERSPECTIVAS	61
9.-	REFERENCIAS	62

Lista de Tablas

1.	Efecto de diferentes MR sobre la transformación reductiva de diferentes compuestos bajo condiciones abióticas y bióticas	14
2.	Especificaciones del proveedor para el óxido de grafeno comercial, Ultra Highly Concentrated Single-Layer Graphene Oxide.	22
3.	Descripción de los experimentos realizados en la reducción química del RR2 y 3CNB.	27
4.	Descripción de los experimentos realizados en la reducción biológica del RR2 y 3CNB, con lodo metanogénico.	27
5.	Descripción de los experimentos realizados en la reducción biológica del RR2 y 3CNB, con lodo sulfato-reductor.	28
6.	Sitios activos presentes en la superficie del OG	34
7.	Eficiencia de reducción y constante de primer orden para la reducción química del RR2 a diferentes concentraciones de OG.	42
8.	Eficiencia de reducción y constante de primer orden para la reducción química del 3CNB a diferentes concentraciones de OG.	42
9.	Eficiencia de reducción y constante de velocidad de primer orden (k) para la reducción química del RR2 bajo diferentes condiciones.	47
10.	Eficiencias de reducción y constante de velocidad de primer orden (k) para la reducción biológica del RR2 bajo diferentes condiciones y tratamientos.	52
11.	Reducción del colorante RR2 en presencia de diferentes mediadores redox, en un sistema metanogénico.	52
12.	Reducción química de diferentes compuestos nitroaromáticos en presencia de un MR a base de carbono.	54

Lista de Figuras

1.	Distribución de la calidad del agua en cuerpos de agua superficiales en México, 2001 (SEMARNAT).	1
2.	Ejemplos de grupos cromóforos y auxocromos de algunos colorantes azo A) Rojo reactivo 2. B) Amarillo mordente 10.	5
3.	Estructura química de algunos colorantes azo.	6
4.	Estructura química de algunos compuestos nitroaromáticos.	7
5.	Principales procesos involucrados en la digestión anaerobia de materia orgánica y su relación con la sulfato reducción.	10
6.	Reducción anaerobia del colorante rojo reactivo 2. Compuesto A, anilina. Compuesto B, o-aminohidroxinaftaleno [Beydilli et al., 2000].	11
7.	Reducción anaerobia de un compuesto nitroaromático hasta anilina. Como intermediarios se muestran el nitrosobenceno y la fenilhidroxilamina [Dunnivant et al., 1992].	12
8.	Principales mecanismos biológicos y químicos implicados en la reducción de contaminantes (RR2 y 3CNB) a sus respectivas aminas aromáticas. Modificado de Cervantes, 2008.	13
9.	Grupos funcionales oxigenados presentes en la superficie de materiales a base de carbono. (a) carboxilos, (b) lactonas, (c) hidroxilos, (d) carbonilos, (e) quinonas, (f) éter, (g) pirona, (h) carboxilos anhídridos, (i) cromenos y (j) lactol.	16
10.	Formación de puentes de hidrógeno debido a la interacción de grupos oxigenados del óxido de grafeno con las moléculas de agua [Bandosz, 2006].	17
11.	Comparación de disponibilidad de sitios activos y reactividad entre el OG y el carbón activado. a) Carbón activado. b) OG. Figuras de color verde, esquematizan las moléculas que reaccionaron con algún grupo funcional. Figuras de color rojo, esquematiza las moléculas que no reaccionaron con algún grupo funcional [Bandosz, 2006; Sun et al., 2012].	18
12.	Espectro de infrarrojo para el óxido de grafeno.	33
13.	Estructura química de la (a) o-benzoquinona y (b) p-benzoquinona	34
14.	Carga superficial del OG a diferentes pH. Círculos, indican la distribución de carga en agua. Triángulos, indican la distribución de carga en medio basal.	36
15.	Distribución de tamaño de partícula para el OG.	37
16.	Posibles interacciones del OG a nivel celular [Bianco et al., 2013].	38
17.	Potencial óxido-reducción de las diferentes especies involucradas en la reducción biótica o abiótica del colorante RR2. pH=7, T=30°C.	39
18.	Potencial óxido-reducción de las diferentes especies involucradas en la reducción biótica o abiótica del compuesto nitroaromático 19.3CNB. pH=7, T=30°C.	39
19.	Esquematación de la formación de estructuras gráficas debido a las	40

- altas concentraciones de OG en el medio.
20. Formación de agregados de carbono a diferentes concentraciones de OG en el medio. A) 2.5mg/L OG, B) 5mg/L OG, C) 10 mg/L OG, D) 25 mg/L OG y E) 50 mg/L OG. 40
 21. Cinética de Reducción Química a diferentes concentraciones OG en el medio. T= 25°C. A) 0.5mM RR2. B) 0.5mM 3CNB. 41
 22. Cinética de reducción química del RR2 en presencia del OG y Na₂S como agente reductor. 5mg/L OG; 0.5 mM RR2; T= 25°C. 46
 23. Cinética de Reducción Biológica para el RR2. T= 25°C. A) Biomasa metanogénica. B) Biomasa sulfato-reductora. 48
 24. Perfil de producción de metano en el experimento de reducción biológica con lodo metanogénico. 49
 25. Consumo de sulfato en el tratamiento con lodo sulfato-reductor (Figuras blancas) y perfil de producción de metano (Figuras negras) a diferentes tiempos. 51
 26. Cinética de reducción química del 3CNB. Figuras negras, representan la concentración de 3CA al final de la cinética. T= 25°C. 54
 27. Cinética de reducción biológica para el 3CNB. T= 25°C. A) Biomasa metanogénica. B) Biomasa sulfato reductora. Figuras negras representan la concentración de 3CA al final de la cinética. 56
 28. Perfil de producción de metano (Figuras blancas) y consumo de sulfato (Figuras negras). A) Lodo metanogénico. B) Lodo sulfato-reductor. 58
 29. Esquematación del efecto “envoltura” sobre el OG por los componentes celulares debido a la lisis celular. 59

RESUMEN

Aplicación del óxido grafeno como mediador redox, en la reducción de contaminantes por un consorcio anaerobio, bajo condiciones metanogénicas y sulfato-reductoras

Actualmente, los serios problemas de contaminación de diferentes cuerpos agua demandan estrategias seguras, robustas, eficaces y competitivas para su tratamiento. Procesos de tratamiento biológico se han colocado como una plataforma efectiva para el tratamiento de cuerpos de agua con diferentes contaminantes; no obstante, con la desventaja de presentar velocidades de reacción lentas. Es por lo anterior, que se han implementado estrategias como el uso de mediadores redox (MR) que permiten acelerar la transferencia de electrones entre el donador primario y aceptor final de electrones.

La capacidad del óxido de grafeno (OG), material a base de carbono, como MR para reducir diferentes contaminantes ha sido pobremente estudiada, a pesar de las propiedades atractivas de este material como su alta capacidad de transferencia de electrones, gran cantidad de grupos oxigenados, su resistencia mecánica y alta superficie específica.

En el presente trabajo se comprobó la capacidad como MR del OG, al aumentar la velocidad de reducción del colorante rojo reactivo 2 (RR2) bajo condiciones metanogénicas y sulfato reductoras.

Por otro lado, el OG actuó como un MR efectivo al aumentar la velocidad de reducción del 3-cloronitrobenceno (3-CNB) bajo condiciones abióticas con sulfuro como donador de electrones. Sin embargo, el OG, no actuó como un MR efectivo en presencia del compuesto 3CNB bajo condiciones metanogénicas y sulfato-reductoras. Lo anterior se pudo deber a un efecto de “envoltura” de los componentes celulares presentes en el medio, debido a la lisis celular generada por el contaminante, los cuales inhibieron la transferencia de electrones hacia el contaminante.

PALABRAS CLAVE: Óxido de grafeno, mediador redox, colorante azo, compuesto nitroaromático, proceso anaerobio, reducción.

ABSTRACT

Graphene oxide as redox mediator in the reduction of pollutants by an anaerobic consortium under methanogenic and sulfate-reducing conditions

Nowadays, the serious water pollution problems require safe, robust, efficient and competitive strategies for their treatment. Biological treatment systems have been placed as an effective platform for the processing of water bodies with different pollutants, with the disadvantage of slow reaction rates. To accelerate the electron transfer between the primary electron donor and final electron acceptor the use of redox mediators (RM) have been implemented.

The capacity of graphene oxide (GO), carbon based material, to serve as RM to reduce different pollutants have been poorly studied, despite the attractive properties such as high electron transfer capability, many oxygenated groups, mechanical strength and high specific surface.

In this thesis the capacity of the GO as RM was found, it increased the reduction rate of red reactive 2 (RR2) under methanogenic and sulfate-reducing conditions.

On the other hand, the GO acted as an effective RM increasing the reduction rate of 3-chloronitrobenzene (3-CNB) under abiotic condition using sulfide as an electron donor. However, the OG, in the presence of 3CNB under methanogenic and sulfate reducing conditions, did not act as an effective RM. This could be due to an “envelope” effect of the cellular components present in the medium due to cell lysis caused by the contaminant, which inhibited the electron transfer to the contaminant.

KEY WORDS: Graphene oxide, redox mediator, azo dye, nitroaromatic compound, anaerobic process, reduction.

1.- INTRODUCCIÓN

El agua no sólo es parte esencial de nuestra propia naturaleza y la de los seres vivos, también contribuye al desarrollo general en todas las actividades humanas. Hoy en día el agua ha sido objeto de una severa contaminación producto de las diferentes actividades humanas, las cuales, incorporan agentes extraños capaces de modificar su composición física, química y la calidad de la misma.

Desde el 2001, estadísticas ya señalaban que en México más del 70% de los cuerpos de aguas superficiales estaban en una categoría de poco a altamente contaminadas (Figura 1) y lamentablemente hasta la fecha esos valores no han descendido (SEMARNAT).

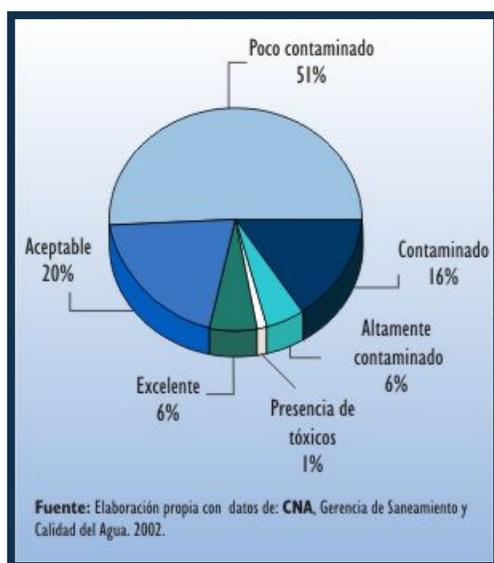


Figura 1. Distribución de la calidad del agua en cuerpos de agua superficiales en México, 2001 (SEMARNAT).

Por otro lado, la industria es uno de los principales motores de crecimiento y desarrollo económico. La mayoría de los procesos industriales requieren de grandes volúmenes de agua para sus procesos; aunado a ello, la falta de tratamiento de los mismos genera efluentes altamente contaminados, los cuales son vertidos al alcantarillado público y/o a cuerpos de aguas naturales, generando un grave problema de contaminación de los ecosistemas.

La industria textil es uno de los sectores industriales con mayor demanda a nivel mundial; sin embargo, de igual forma, es uno de los sectores que generan una mayor contaminación de sus efluentes, careciendo de un tren de tratamiento de las mismas [Martínez et al., 2013]. Altas concentraciones de colorantes están presentes en efluentes textiles debido al pobre grado de fijación que presentan algunos de ellos. Por lo anterior, primeramente se genera un problema estético; sin embargo, problemas más graves como inhibición de la actividad fotosintética, dificultando el paso de la luz, o efectos carcinogénicos y mutagénicos están asociados a ellos [dos Santos, 2005]. De igual forma, otra característica de los efluentes textiles, es que usualmente contienen una concentración alta de sulfatos. El sulfato es un aditivo común en las tinas de tinción o puede ser generado a partir de compuestos sulfurados más reducidos, como el sulfuro y la ditionita, que son utilizados en los procesos de tinción de telas. La presencia del sulfato en sistemas anaerobios aplicados en el tratamiento de efluentes de la industria textil, podría tener un efecto importante sobre la reducción de los colorantes [van der Zee et al., 2003]. El mayor grupo de colorantes utilizado a nivel industrial son los tipo azo, caracterizados por su doble enlace nitrógeno-nitrógeno (-N=N-), algunos de ellos son altamente recalcitrantes y tóxicos, como el colorante rojo reactivo 2 (RR2) [van der Zee, 2002], que se estudia en el presente trabajo.

Otra clase de contaminantes altamente tóxicos y ampliamente utilizados a nivel industrial en la elaboración de explosivos, pesticidas, colorantes y medicinas, son los compuestos nitroaromáticos, catalogados por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA) como contaminantes prioritarios [Li et al., 2008]. Estas moléculas orgánicas que contienen al menos un grupo nitro (-NO₂) unido a un anillo aromático, se han introducido y/o dispersado al medio ambiente de manera intencional, como plaguicidas, o debido a un manejo inadecuado y/o malas prácticas de almacenamiento de los productores o de los usuarios de los mismos [Ju et al., 2010]. Efectos tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos están vinculados a ellos [Padda et al., 2003; Purohit et al., 2000].

Diferentes procesos fisicoquímicos como degradación fotocatalítica, coagulación, floculación, intercambio iónico, nanofiltración, ozonización, entre otros, se han

implementado como una estrategia de tratamiento para aguas residuales industriales con los presentes contaminantes; sin embargo, la aplicación de algunas de las tecnologías está limitada por bajas eficiencias y sobre todo a altos costos [Qiuju et al., 2014]. Por otro lado, los procesos biológicos se han colocado como una plataforma robusta, pero en desarrollo, para el tratamiento de aguas residuales con compuestos nitroaromáticos y colorantes azo.

Se sabe que estos contaminantes no pueden ser degradados eficientemente en sistemas biológicos aerobios convencionales. Lo anterior es debido, en el caso de los colorantes azo, a que existen múltiples grupos funcionales altamente oxidados en su estructura, que compiten con el oxígeno por los electrones disponibles en los biorreactores aerobios [Cervantes, 2008]. En el caso de los compuestos nitroaromáticos, se atribuye a la fuerte atracción de electrones del grupo nitro [Li et al., 2014]. Sin embargo, bajo condiciones anaerobias, estos compuestos pueden ser reducidos a aminas aromáticas [Cervantes, 2008], no obstante, requiriendo largos tiempos de retención hidráulica (TRH) a consecuencia de velocidades de reacción lentas [van der Zee et. al., 2002; dos Santos et al., 2005]. Para contrarrestar lo anterior, varios catalizadores con propiedades óxido-reductoras (redox) han sido aplicados a sistemas de tratamiento anaerobios logrando un aumento de varios órdenes de magnitud en la velocidad de reducción de una amplia gama de contaminantes [Cervantes, 2008].

Recientemente, el óxido de grafeno (OG), material a base de carbono, se ha posicionado como un candidato ideal para una gran variedad de aplicaciones debido a sus características únicas tanto físicas como químicas [Qiuju et al., 2014], como el alto contenido de grupos oxigenados (C/O entre 3 y 2) [Bianco et al., 2013], los cuales le confieren la capacidad de actuar como mediador redox para promover la reducción de contaminantes [Heyun et al., 2013].

En el presente trabajo, las propiedades fisicoquímicas del OG se evaluaron mediante determinación de grupos funcionales por espectroscopia Infrarrojo por Transformada de Fourier, cuantificación de grupos oxigenados por el método de Boehm (1994), potencial Z y distribución de partículas. Finalmente, el OG se

empleó como mediador redox para reducir química y biológicamente un colorante azo (RR2) y un compuesto nitroaromático (3-cloronitrobenceno (3CNB)).

2.- MARCO TEÓRICO

2.1.- CONTAMINANTES

2.1.1.- COLORANTES AZO

Los colorantes son compuestos aromáticos que absorben energía electromagnética en el rango visible (350-700 nm). Presentan en su estructura, como se muestra en la Figura 2, grupos cromóforos que se caracterizan por un sistema de electrones deslocalizados con dobles enlaces conjugados y auxocromos, cuyos grupos funcionales presentan la capacidad de donar electrones. Basados en su estructura química o grupo cromóforo, se pueden diferenciar entre 20-30 grupos de colorantes [van der Zee, 2002]. Las industrias que más consumen colorantes son la textil, papelera, farmacéutica y de curtiduría, de los cuales, el 70% está representado por colorantes tipo azo [Cervantes, 2008]. Los colorantes tipo azo, se caracterizan por tener al menos un grupo cromóforo azo (-N=N-) en su estructura química, como se puede observar en la Figura 2.

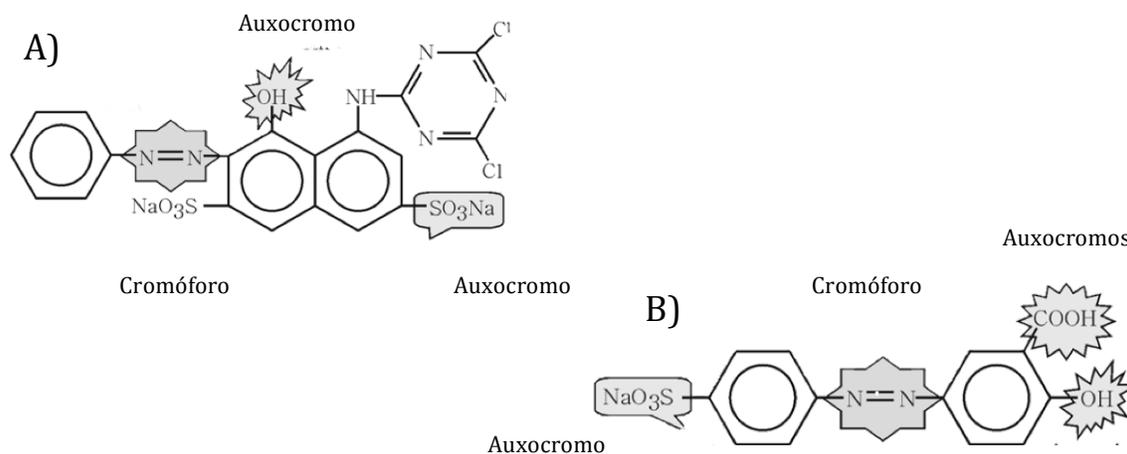


Figura 2. Ejemplos de grupos cromóforos y auxocromos de algunos colorantes azo
A) Rojo reactivo 2. B) Amarillo mordente 10.

Este grupo de colorantes se caracteriza por ser reactivos y formar enlaces covalentes entre los grupos -OH, -NH- o -SH-, y las fibras de algodón, lana, seda, y nylon. En la Figura 3 se muestra la estructura de algunos colorantes tipo azo. La

capacidad de los colorantes para adherirse a las fibras está en función del tipo de colorante que se emplee, al igual que sus características físicas y químicas [Cervantes, 2008].

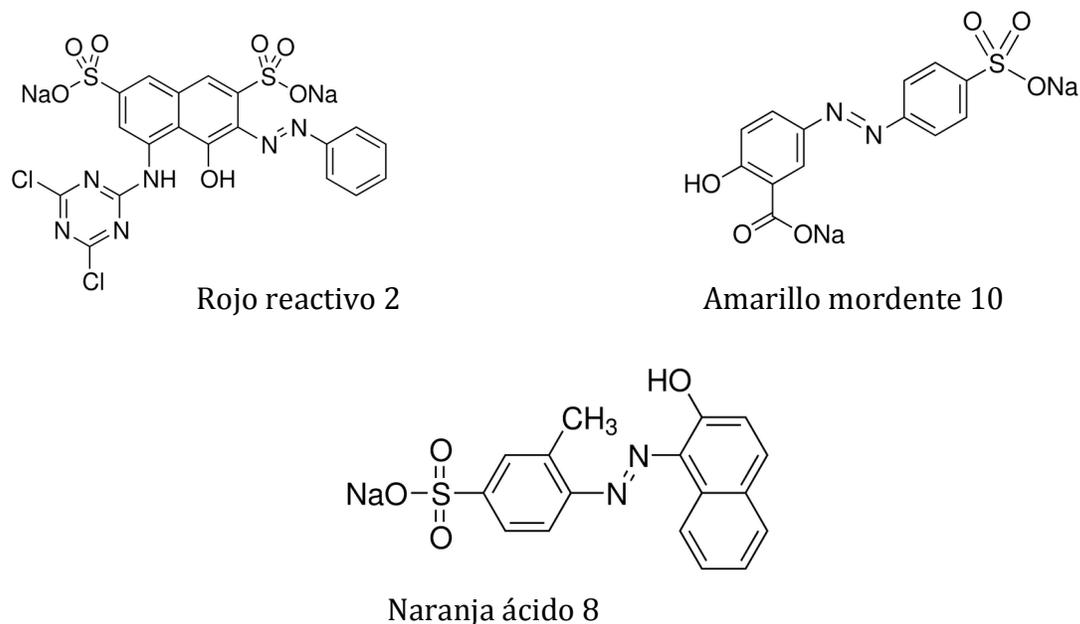


Figura 3. Estructura química de algunos colorantes azo.

2.1.2.- COMPUESTOS NITROAROMÁTICOS

Los compuestos nitroaromáticos son moléculas orgánicas que contienen al menos un grupo nitro (-NO₂) unido a un anillo aromático en su estructura química, como se muestra en la Figura 4. La mayoría de ellos son de origen antropogénico y se utilizan como precursores en la fabricación de explosivos, colorantes, espuma de poliuretano, herbicidas, insecticidas y disolventes. Un ejemplo de compuestos nitroaromáticos son los cloronitrobenzenos, utilizados de igual forma como intermediarios para producir compuestos orgánicos de interés industrial, como pesticidas, colorantes y productos farmacéuticos [Arora et al., 2012].

La mayoría de los compuestos nitroaromáticos han sido introducidos a los ecosistemas naturales por actividades antropogénicas, como (1) producto de una combustión incompleta, (2) por una inadecuada disposición final luego de ser utilizados en los procesos en los cuales son materia prima o intermediarios

sintéticos o (3) aplicados intencionalmente al medio ambiente, como los plaguicidas [Ju et al., 2010].

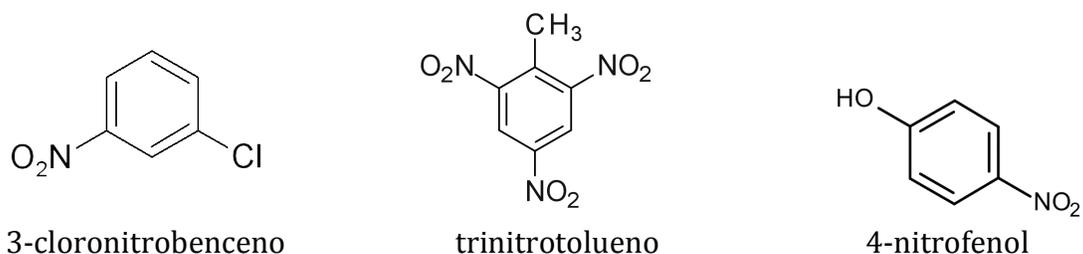


Figura 4. Estructura química de algunos compuestos nitroaromáticos.

2.2.- EFECTOS A LA SALUD Y AL MEDIO AMBIENTE

Graves problemas ambientales y de salud están estrechamente asociados a efluentes o sitios contaminados con compuestos nitroaromáticos y colorantes azo.

2.2.1.- COLORANTES AZO

Problemas estéticos se generan en efluentes con altas cargas de colorantes de hasta 200 ppm, algunos de ellos visibles a concentraciones por debajo de 1 ppm, a consecuencia de las bajas tasas de fijación, debido a la hidrólisis que sufre la molécula, y su alta persistencia, dada su estabilidad química y fotocatalítica, generando un problema en un inicio estético [van der Zee, 2002]. De igual forma, la presencia de colorantes afecta la actividad fotosintética de algunas plantas acuáticas y algas, ya que fungen como una barrera para el paso de luz. Finalmente, problemas de alergias, cáncer y mutagenicidad están asociados a dichos compuestos y a la formación de sus respectivas aminas aromáticas [dos Santos, 2005].

2.2.2.- COMPUESTOS NITROAROMÁTICOS

Los compuestos nitroaromáticos permanecen por largos periodos de tiempo en el ambiente, donde constituyen una fuente dañina para los organismos presentes en el ecosistema. Dichos compuestos pueden penetrar la piel con relativa facilidad, al igual que el tracto gastrointestinal o respiratorio distribuyéndose en diferentes

tejidos del cuerpo humano. De igual forma, induce anemia bajo condiciones de exposición crónica. Se han encontrado casos de irritación cutánea, daño en hígado, riñón y generación de tumores [OMS, 2009].

Debido a su naturaleza altamente tóxica, la Agencia Estatal de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) ha catalogado algunos compuestos nitroaromáticos, entre ellos compuestos cloronitroaromáticos, como contaminantes prioritarios para su remediación [Li et al, 2008].

2.3.- TÉCNICAS PARA TRATAMIENTO DE EFLUENTES CONTAMINADOS CON COMPUESTOS NITROAROMÁTICOS Y COLORANTES AZO

El uso de cualquier técnica de remediación dependerá de la oportuna evaluación de los siguientes factores [García, 2008]:

- Tipo de contaminante.
- Composición del cuerpo de agua.
- Dosis y costos de químicos requeridos.
- Costos operacionales (material y energía).
- Destino ambiental y costos de manejo de productos generados.

Diferentes procesos fisicoquímicos como degradación fotocatalítica, coagulación, floculación, intercambio iónico, nanofiltración, ozonización, entre otros, se han implementado para el tratamiento de efluentes ricos en colorantes azo y nitroaromáticos; sin embargo, la aplicación de dichas tecnologías está limitada por bajas eficiencias y altos costos de operación e instalación [Quiju et al., 2004].

Los sistemas biológicos, por el contrario, han emergido como una alternativa viable para el tratamiento de diferentes efluentes, con las ventajas de ser económicos, de bajos costos operacionales y amigables con el medio ambiente [Martínez et al., 2013].

Para algunos compuestos nitroaromáticos (3CNB) y azo aromáticos (RR2) específicamente, un proceso biológico aerobio resulta inadecuado para su tratamiento. Lo anterior debido a que poseen características recalcitrantes, conteniendo uno o más grupos electrofílicos en su estructura, lo que provoca que compitan con el oxígeno por los electrones que darían lugar a su reducción [Field

et al., 2000]. Por otro lado, bajo condiciones anaerobias, estos compuestos pueden ser reducidos a sus respectivas aminas aromáticas; no obstante, la transferencia de electrones del donador primario de electrones, al aceptor terminal de electrones (contaminante), generalmente representa un aspecto limitante en la reacción [van der Zee, 2002].

Ante este inconveniente, la adición de catalizadores con propiedades óxido-reductoras (redox), ha demostrado un efecto positivo aumentando las tasas de transformación de diversos grupos de contaminantes, logrando un aumento de varios órdenes de magnitud en la reducción de múltiples contaminantes [dos santos et al 2006b; dos Santos et al. 2007].

2.4.- DIGESTIÓN ANAEROBIA

La digestión anaerobia consiste en una serie de reacciones, donde se involucran diferentes grupos microbianos, que en ausencia de oxígeno, degradan la materia orgánica hasta metano y dióxido de carbono como productos finales.

Las etapas del proceso de digestión anaerobia de la materia orgánica compleja se muestran en la Figura 5 y contempla las siguientes etapas principales: 1) acidogénesis, los polímeros y otras sustancias complejas son hidrolizadas y fermentadas para dar productos más simples como el ácido acético, que es el principal precursor del metano, ácidos grasos volátiles (AGV), hidrógeno, CO₂ y pequeñas cantidades de etanol; 2) acetogénesis, dependiendo de la longitud de la cadena de los AGV, éstos son transformados hasta acetato, hidrógeno y CO₂ y 3) metanogénesis, principalmente mediante dos tipos de reacciones; la acetoclástica que consiste en la descarboxilación del ácido acético y la hidrogenotrófica que consiste en la reducción del dióxido de carbono con hidrógeno.

Las aguas residuales de diferentes industrias, como la industria textil, usualmente contienen una concentración alta de sulfatos. En este escenario las bacterias sulfato reductoras (SBR) son capaces de utilizar diversos intermediarios de los procesos de degradación anaerobia (Figura 5). Bajo condiciones sulfato-reductoras pueden ocurrir las siguientes reacciones [Espinoza B, 2007]:

- Oxidación de AGV con más de dos átomos de carbono por las BSR.

- Oxidación de acetato por BSR acetotróficas (BSRA) e hidrógeno molecular por BSR hidrogenotróficas.

Por otro lado, la presencia del sulfato en sistemas anaerobios aplicados en el tratamiento de aguas residuales, podría tener un efecto importante considerando los siguientes puntos: 1) el sulfato podría competir con los contaminantes (como los colorantes azo) por los electrones disponibles en los digestores anaerobios; 2) la generación de electrones a partir de la oxidación de diferentes sustratos, ligado a la sulfato-reducción, podría promover la reducción de colorantes azo a través de cofactores que canalicen los electrones hacia estos contaminantes; y 3) el sulfuro generado vía sulfato-reducción podría contribuir, a través de reacciones químicas, en la reducción de los contaminantes (van der Zee et al., 2003; Cervantes et al., 2007).

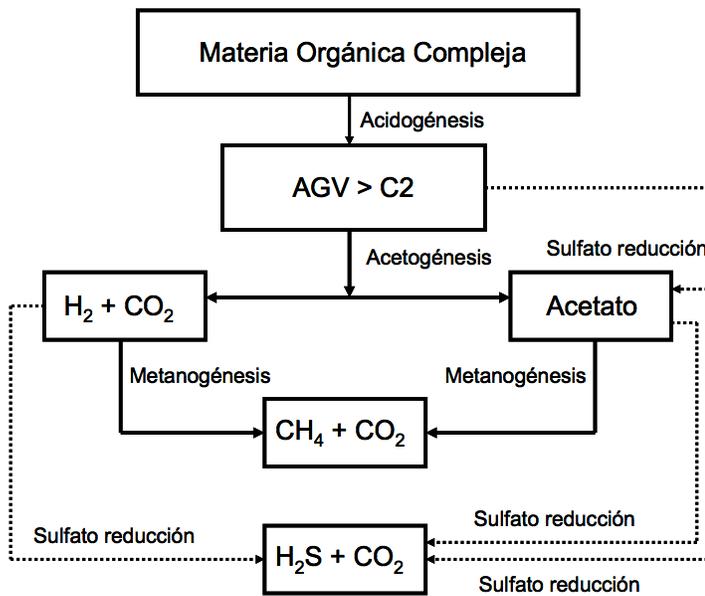


Figura 5. Principales procesos involucrados en la digestión anaerobia de materia orgánica y su relación con la sulfato reducción.

2.4.1.- REDUCCIÓN DE COLORANTES AZO BAJO CONDICIONES ANAEROBIAS

El mecanismo de reducción anaerobia de colorantes azo consiste en la ruptura reductiva de los enlaces azo presentes en la estructura de estos compuestos. Es

decir, los enlaces $-N=N-$ son reducidos para formar aminas aromáticas como se muestra en la Figura 6. La reducción de colorantes azo se relaciona con una pérdida de color en el cuerpo de agua, ya que el grupo cromóforo es precisamente el (los) enlace(s) azo [Cervantes, 2008].

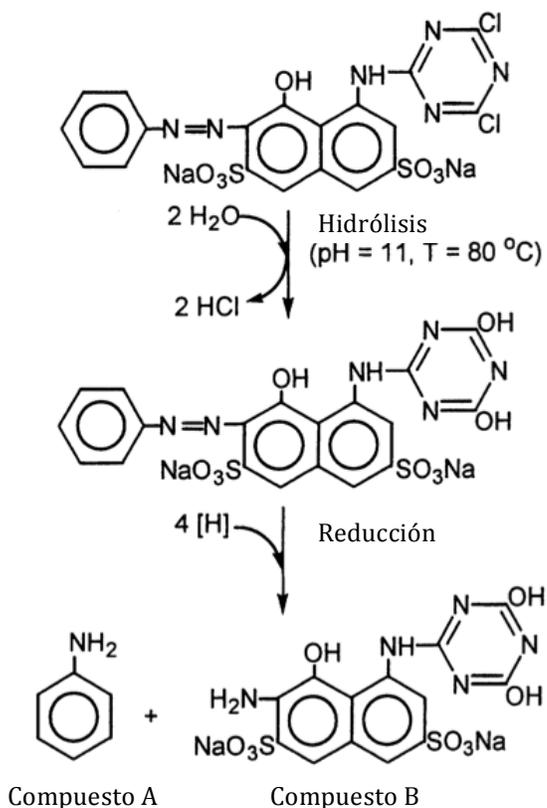


Figura 6. Reducción anaerobia de colorantes rojo reactivo 2. Compuesto A, anilina. Compuesto B, o-aminohidroxy-naftaleno [Beydilli et al., 2000].

2.4.2.- REDUCCIÓN DE COMPUESTOS NITROAROMÁTICOS BAJO CONDICIONES ANAEROBIAS

El mecanismo de reducción de los compuestos nitroaromáticos mono-sustituidos, a sus respectivos productos de reducción se lleva a cabo como se muestra en la Figura 7, en el cual ocurre una adición de electrones y sucesivas protonaciones. Las especies intermediarias (nitrosobenceno y fenilhidroxilamina), son de difícil detección debido a su reactividad e inestabilidad [Dunnivant et al., 1992].

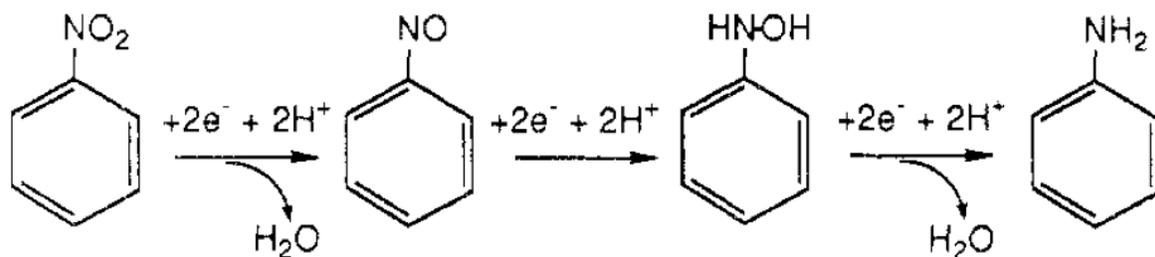


Figura 7. Reducción anaerobia de un compuesto nitroaromático hasta anilina. Como intermediarios se muestra el nitrosobenceno y la fenilhidroxilamina [Dunnivant et al., 1992].

Los principales mecanismos biológicos y químicos involucrados en la reducción de ambos contaminantes (RR2 y 3CNB) a sus respectivas aminas aromáticas, se muestran en la Figura 8 y se enumeran a continuación, (1) una reducción química directa dado los agentes reductores de origen biológico (ej. sulfuro, Fe^{2+} , cisteína, et), (2) reacciones biológicas, ya sea directamente catalizadas por una reacción enzimática o indirectamente a través de la reducción de cofactores enzimáticos o acarreadores de electrones estarán involucrados en la reducción de ambos contaminantes [van der Zee, 2002].

Sin embargo, como se mencionó anteriormente, ambos contaminantes electrofílicos por naturaleza, requieren de varios días para lograr su reducción en sistemas de tratamiento anaerobios [Dunnivant et al., 1992, Field et al., 2003]. Por lo anterior, el uso de catalizadores con propiedades óxido-reductoras han sido aplicados a sistemas de tratamiento anaerobios logrando un aumento de varios órdenes de magnitud en la velocidad de reducción de una amplia gama de contaminantes [dos Santos et al., 2006b; dos Santos et al., 2007].

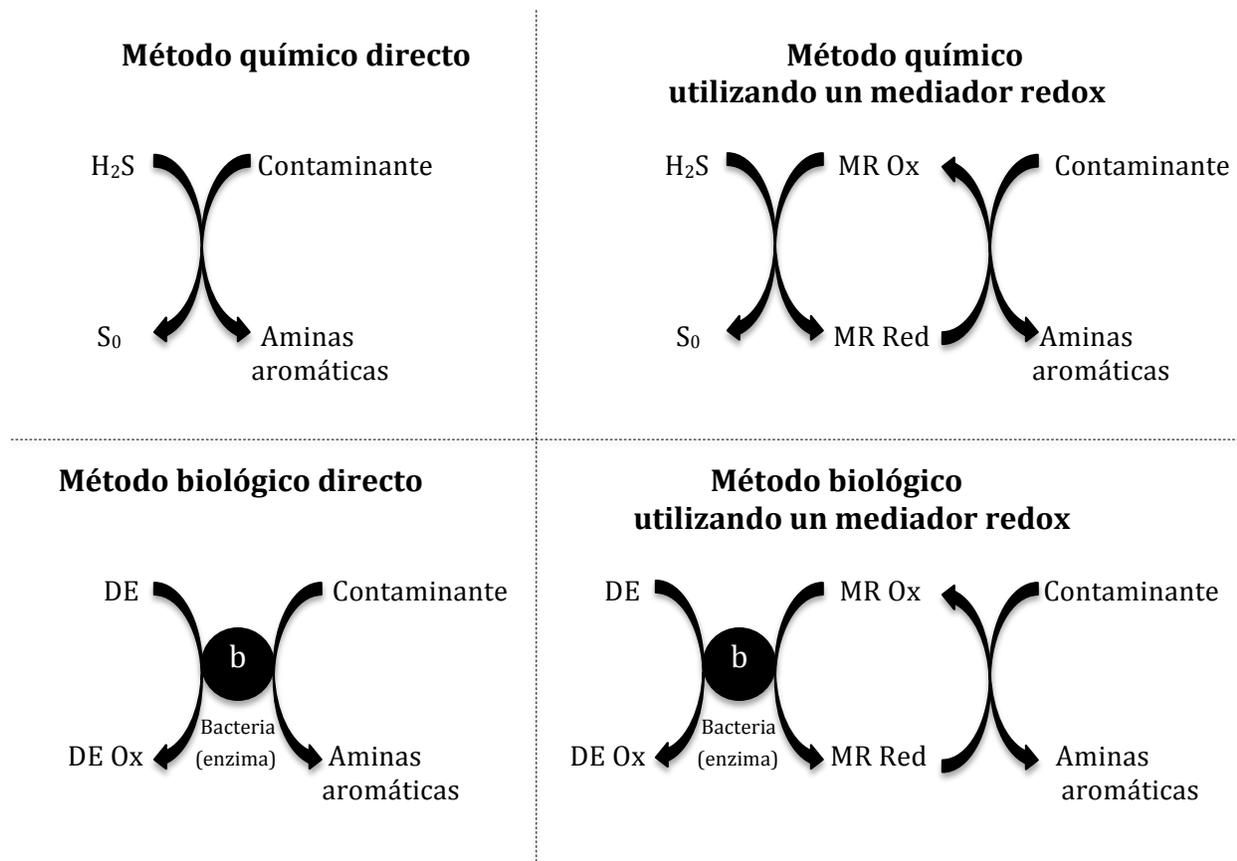


Figura 8. Principales mecanismos biológicos y químicos implicados en la reducción de contaminantes (RR2 y 3CNB) a sus respectivas aminas aromáticas. Modificado de Cervantes, 2008.

Donde: MR= mediador redox, Ox= oxidado, Red= reducido, DE= donador de electrones.

2.5.- MEDIADORES REDOX EN PROCESOS REDUCTIVOS DE CONTAMINANTES

Un mediador redox (MR) es una molécula o elemento capaz de oxidarse y reducirse cíclicamente, lo que le confiere la capacidad de actuar como transportador de electrones en múltiples reacciones. Los MR aceleran la reacción redox disminuyendo la energía de activación de la reacción global, o bien, en algunos casos su presencia es necesaria para que la reacción se efectúe. Para que un MR pueda ser un transportador de electrones efectivo, su potencial redox estándar (E'_0) idealmente deberá estar entre los potenciales redox del donador primario y aceptor final de electrones [van der Zee et al., 2009].

Actualmente se han estudiado una gran variedad de compuestos con capacidad para actuar como MR, algunos de ellos se enlistan en la Tabla 1.

Por otra parte, es importante comentar que parámetros ambientales, como potencial redox, temperatura [dos santos et al., 2004], y estructura química influyen la reactividad de los catalizadores durante la transformación de los contaminantes [Rau et al., 2002]. Sin embargo, como se muestra en la Tabla 1, el uso de MR ha permitido aumentar las eficiencias de reducción de múltiples contaminantes al igual que los coeficientes de velocidad de reducción

Tabla 1. Efecto de diferentes MR sobre la transformación reductiva de diferentes compuestos bajo condiciones abióticas y bióticas

Reactivo → producto	Donador de electrones	Mediador redox	Tipo de proceso	Resultados	Referencia
RR2, RR4 → anilina	Glucosa	Riboflavina	Biótico	RR2: 1.7x ^a , RR4: no presentó diferencia	Dos Santos et al. (2006)
4NF, 3CNB → aminas aromáticas	Sulfuro	Fibras de carbón activado	Abiótico	Para el 3CNB una diferencia de reducción de 40% respecto a los control. Para el 4NF una diferencia de reducción de 60% respecto a los control.	Amezquita-García et al. (2013)
Nitrobenzeno → anilina	Sulfuro	Óxido de grafeno	Abiótico	La constante de segundo orden para OG fue de 10 ⁻³ L·h ⁻¹ ·mg ⁻¹ , 2 órdenes de magnitud mayor que para el control de 10 ⁻⁶ L·h ⁻¹ ·mg ⁻¹ .	Fu et al. (2013)
Nitrobenzeno → anilina	Glucosa	RGO/AL ^a	Biótico	Mayor reducción respecto al control hasta de un 20%.	Wang et al. (2013)
Colorantes azo → aminas aromáticas	Glucosa	AQDS	Biótico	Las eficiencias de biodegradación aumentaron mas de 3 veces respecto a los controles.	Jing et al. (2009)
Naranja ácido 7 → ácido sulfanílico	Henna-Glucosa	Henna	Biótico	La tasa de reducción fue 6 veces mayor respecto a los controles.	Huang et al. (2013)

***Continuación (Tabla1)**

AM10, RR120, NA10 → aminas aromáticas	Ácidos grasos volátiles	Carbón activado	Biótico	AM10 y RR120 tasa de decoloración 1.5 mayor que los control. NA10, hasta un 98% d reducción. No reducción en los experimentos control.	Pereira et al. (2014)
RR24, RR2, RA1, RA14→ anilina	Extracto de levadura/ peptona	Ácido bromoamina	Biótico	RR24, 1.9x; RR2, 1.7x; RA1, 1.5xM RA14, 1.3x.	Guo et al. (2007)
RR2→ anilina	Glucosa/ Ácidos grasos volátiles	AQDS, VB12, Riboflavina, AQS	Biótico	AQDS, 1.4x; VB12, 0.82x; Riboflavina, 8.09x; AQS, 2.6x.	Dos Santos (2005)
NR5 → amina aromática	Acetato de sodio	Carbón activado	Biótico	>88% de conversión. La ER estuvo influenciada por el AS.	Mezohegyi et al. (2010)

^ax" significa el aumento en la constante de velocidad de primer orden comparado con el control sin mediador.
RGO/AL= Óxido de grafeno reducido/lodo anaerobio, NF= nitrofenol, CNB= cloronitrobenzeno, AM= amarillo mordente, RR= rojo reactivo, NA= naranja ácido, RA= rojo ácido, NR= negro reactivo AQDS= Antraquinona-2,6-disulfonada, AQS= Antraquinona-2-sulfonada, VB12=vitamina B 12, ER= eficiencia de reducción, AS= área superficial.

2.5.1.- MATERIALES A BASE DE CARBONO COMO MEDIADORES REDOX

De manera general, los materiales de carbono se componen principalmente del elemento carbono. Debido a su estructura atómica (que incluye orbitales $1s^2$, $2s^2$, $2p^2$) este elemento tiene posibilidades únicas de enlace, tanto con otros elementos como con sí mismo. Dependiendo del tipo de hibridación de los átomos de carbono, éstos son capaces de unirse con otros átomos de carbono y formar diferentes estructuras.

Específicamente, los carbones activados, los cuales incluyen una gran variedad de materiales carbonosos amorfos en forma de fibras, gránulos, telas, entre otros, se han desarrollado para un gran número de aplicaciones especializadas, tanto como materiales estructurales y funcionales. Lo anterior, debido a la química de coordinación que le proporciona una capacidad de formar estructuras en 3 dimensiones y a su capacidad para reaccionar con otros heteroátomos tales como el hidrógeno, boro, nitrógeno y oxígeno, tanto en su superficie como al interior de la misma [Bandosz, 2006].

En general, el carbón activado posee propiedades catalíticas como MR, atribuibles a la vasta diversidad de grupos funcionales oxigenados, como los grupos quinona, presentes en la superficie del material, como se muestra en la Figura 9. Pereira et al. (2014) ha demostrado el papel de la química superficial del carbón activado en la catálisis de reducción química y biológica de diferentes contaminantes.

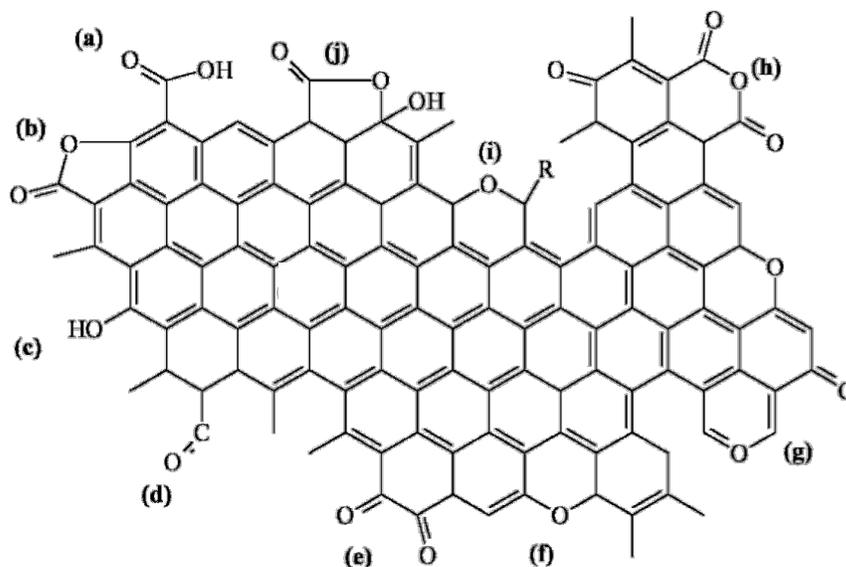


Figura 9. Grupos funcionales oxigenados presentes en la superficie de materiales a base de carbono. (a) carboxilos, (b) lactonas, (c) hidroxilos, (d) carbonilos, (e) quinonas, (f) éter, (g) pirona, (h) carboxilos anhídridos, (i) cromenos y (j) lactol [Bandosz, 2006].

De igual forma, Van der Zee et al. (2003) demostraron la capacidad como MR del carbón activado en un biorreactor anaerobio, en presencia de un colorante, obteniendo eficiencias de decoloración hasta en un 97% comparado con 60% de eficiencia en el biorreactor control sin carbón activado.

En la Tabla 1 se enlistan algunos trabajos en donde se han utilizado materiales a base de carbono como MR para la reducción de diferentes contaminantes.

2.5.2.- ÓXIDO DE GRAFENO COMO MEDIADOR REDOX

El óxido de grafeno (OG), material a base de carbono, reportado por primera vez en 1840 por Schafhaeutl C. y posteriormente en 1859 por Brodie BC; consiste en

una lámina con una distribución aleatoria de zonas oxidadas con grupos funcionales epoxi, carbonil, carboxil, hidroxil, entre otros (Figura 9), en combinación con regiones no oxidadas donde la mayoría de los átomos de carbono preservan la hibridación sp^2 [Pei et al., 2012]. Generalmente la composición química del OG puede variar entre una relación C/O de 1.12 a 5, dependiendo del método de síntesis. Sin embargo, la estructura química precisa de OG todavía no es clara, debido al carácter parcial amorfo del OG, lo que contribuye a la complejidad del mismo [Lesiak et al., 2014].

El OG se dispersa fácilmente en agua, debido a la gran variedad de grupos oxigenados en su superficie que le permiten interactuar con las moléculas de agua, formando puentes de hidrógeno, como se muestra en la Figura 10.

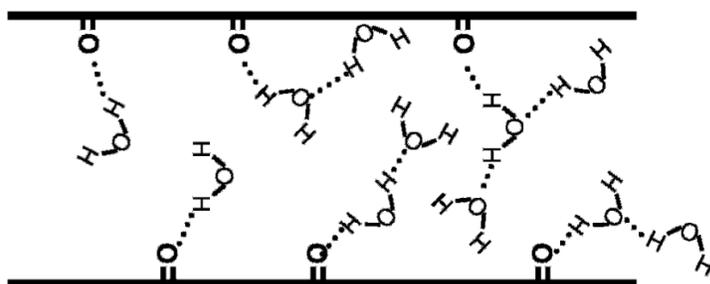


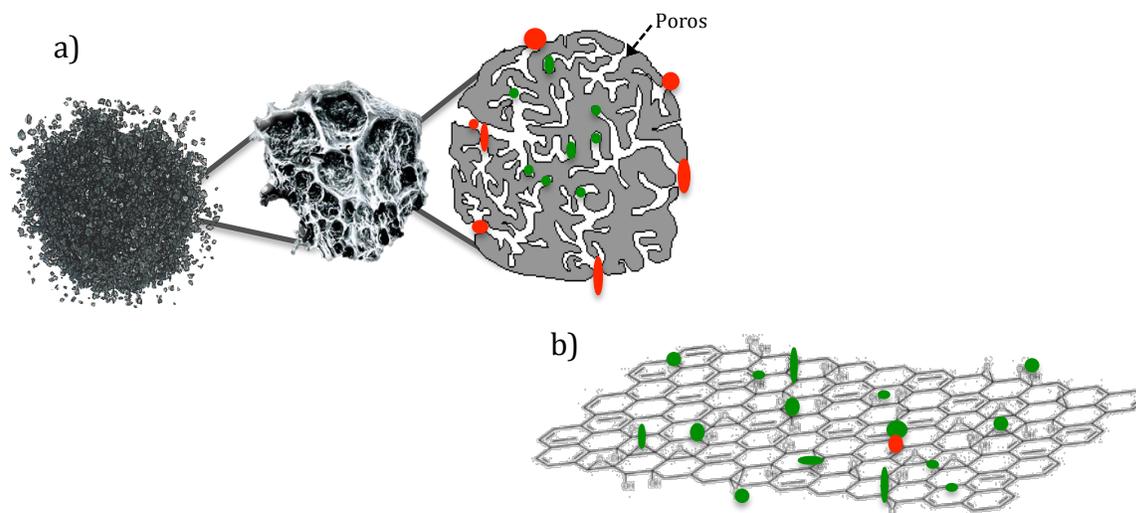
Figura 10. Formación de puentes de hidrógeno debido a la interacción de grupos oxigenados del óxido de grafeno con las moléculas de agua [Bandosz, 2006].

Al igual que otros materiales a base de carbono, el OG es de fácil manipulación y modificación. Grupos funcionales se pueden añadir para aumentar o disminuir su carácter hidrófilo, como lo realizaron Wang et al. (2009), o para hacerlo más afín a una molécula [Li et al., 2013; Agnoli et al., 2013].

El OG presenta ventajas por sobre otros materiales a base de carbono, gracias a la exposición total de sitios activos a lo largo de toda su área superficial [Sun et al., 2012], estimada en 2630 m^2/g [Terrones et al., 2012], en la cual fenómenos difusionales, que aumentan el tiempo de reacción, no se llevan a cabo. Fu et al. (2013) compararon el OG y el grafito en presencia de un compuesto nitroaromático, utilizando concentraciones de 5 mg/L de OG y 1200 mg/L de

grafito obteniendo porcentajes de reducción del 99 y 60 % en presencia de OG y grafito respectivamente, comprobando de cierta manera lo antes mencionado.

De igual forma, impedimentos estéricos, ocurren en menor medida en el OG, permitiendo una mayor reactividad de los sitios activos sobre el contaminante (Figura 11).



*Figura 11. Comparación de disponibilidad de sitios activos y reactividad entre el OG y el carbón activado. a) Carbón activado. b) OG. Figuras de color verde, esquematizan las moléculas que reaccionaron con algún grupo funcional. Figuras de color rojo, esquematizan las moléculas que **no** reaccionaron con algún grupo funcional [Bandosz, 2006; Sun et al., 2012].*

El OG se ha posicionado como un candidato ideal para una gran variedad de aplicaciones en celdas solares, síntesis de compuestos poliméricos, producción de H_2 , liberación controlada de fármacos, electrónica, sensores químicos y como catalizador [Qiuju et al., 2014]. Este último, gracias a la gran cantidad de grupos funcionales oxigenados presentes en su superficie, como los grupos lactona, quinona, entre otros, con capacidad para transferir electrones; y de igual manera a los carbonos insaturados, que poseen electrones desapareados, localizados en los bordes y defectos del OG, los cuales en conjunto con los grupos oxigenados

permiten acelerar las tasas de reducción de diferentes contaminantes [van der zee, 2002; Bandosz, 2006; Heyun et al., 2013].

Trabajos como los de Fu et al. y Wang et al., ambos en el 2013, demuestran, con cierta reserva, la capacidad del OG como MR, al aumentar el porcentaje de reducción y la velocidad de reacción de un compuesto nitroaromático, en un ambiente químico y biológico, respectivamente. Ambos trabajos son pioneros en la evaluación de la capacidad como MR del OG, con resultados prometedores.

3.- JUSTIFICACIÓN

Actualmente, los procesos biológicos para el tratamiento de aguas residuales han resultado ser una plataforma viable para la degradación de diversos compuestos. Algunos contaminantes, como los colorantes azo y compuestos nitroaromáticos, demandan tratamientos anaerobios para llevar a cabo su biotransformación. No obstante, pese a la efectividad del proceso, presentan limitaciones como bajas velocidades de reacción, demandando largos tiempos de retención hidráulica, lo cual no es deseable en procesos industriales. Es por lo anterior, que la implementación de mediadores redox en procesos de tratamiento de agua ha resultado ser una alternativa viable para combatir las bajas velocidades de reacción, acelerándolas. En la búsqueda de nuevos mediadores redox, el óxido de grafeno, material a base de carbono, se ha posicionado como un candidato ideal para una gran variedad de aplicaciones debido a sus características únicas tanto físicas como químicas, como el alto contenido de grupos oxigenados, los cuales le confieren la capacidad de actuar como mediador redox para promover la reducción de contaminantes.

Por lo anterior, en el presente trabajo se pretende evaluar, en un ambiente químico y biológico, la capacidad como mediador redox del OG para acelerar la tasa de degradación de dos contaminantes, RR2 y 3CNB, altamente recalcitrantes y tóxicos para la salud y medio ambiente.

4.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1.- HIPÓTESIS

El óxido de grafeno, gracias a la gran cantidad de grupos funcionales oxigenados presentes en su superficie y a su alta cantidad de electrones desapareados presentes en los bordes y defectos del material, influirá sobre la reducción de diferentes contaminantes, acelerando la transferencia de electrones y aumentando la velocidad de reducción de los mismos.

4.2.- OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad del óxido de grafeno como mediador redox, en la reducción del colorante rojo reactivo 2 y del compuesto nitroaromático 3-cloronitrobenzono, en un sistema químico y biológico. Este último bajo condiciones metanogénicas y sulfato-reductoras.

4.2.1.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Anticipar la capacidad del OG como MR, con base en su potencial redox, presencia de grupos funcionales oxigenados, carga superficial y tamaño de partícula.
- Evaluar la capacidad del OG como MR en presencia del colorante RR2 y del compuesto nitroaromático 3CNB en un ambiente químico, utilizando Na_2S como agente reductor.
- Evaluar la capacidad del OG como MR en presencia del colorante RR2 y del compuesto nitroaromático 3CNB, utilizando lodo anaerobio bajo condiciones metanogénicas y sulfato reductoras y un sustrato orgánico como donador de electrones.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- MATERIALES

5.1.1.- ÓXIDO DE GRAFENO

Se utilizó OG “Ultra Highly Concentrated Single-Layer Graphene Oxide” de GRAPHENE SUPERMARKET®, con las especificaciones indicadas en la Tabla 2.

Tabla 2. Especificaciones del proveedor para el óxido de grafeno comercial, Ultra Highly Concentrated Single-Layer Graphene Oxide.

Concentración	6.2 g/l
Relación C/O	3.95
Monocapa	>80%
Tamaño de la lámina	0.5-5 micrones
Contenido de cenizas	1.085 g solidos/175 ml
Color	Café
Viscosidad	Alta
Solución acuosa	

5.1.2.- ROJO REACTIVO 2

Se utilizó RR2 Procion® Red MX-5B de SIGMA-ALDRICH® con una pureza del 40%.

5.1.3.- 3-CLORONITROBENCENO

Se utilizó 3CNB de la marca SIGMA-ALDRICH® con una pureza del 98%.

5.1.4.- 3-CLOROANILINA

La 3-cloroanilina (3CA) se utilizó de la marca SIGMA-ALDRICH® con una pureza del 99%.

5.1.5.- ANILINA

La anilina se utilizó de la marca SIGMA-ALDRICH® con una pureza del 99.5%.

5.1.6.- INÓCULO

Se utilizó lodo granular anaerobio proveniente de un reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB) de una planta cervecera del estado de Sonora. El lodo se aclimató por 5 meses en un reactor UASB (1.5L), operado bajo condiciones metanogénicas y sulfato-reductoras, con un tiempo de retención hidráulica (TRH) de 1 día y 1g de demanda química de oxígeno (DQO)/L a 25°C. Para ambos reactores se utilizó como fuente de energía una mezcla de lactato/etanol (0.5/0.5 en términos de DQO). En ambos reactores se obtuvieron eficiencias de remoción de DQO alrededor del 90%. Al reactor sulfato-reductor se le añadió una concentración de 1g de SO_4^{-2} /L, alcanzándose una remoción de sulfato >80%.

5.2.- SOLUCIONES

5.2.1.- MEDIO BASAL

El medio mineral se utilizó, para todos los experimentos, con la siguiente composición (mg l^{-1}) NH_4Cl (280), K_2HPO_4 (250), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (100), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10), NaHCO_3 (5000) y 1ml de la solución de elementos traza (mg/L): $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2000), H_3BO_3 (50), ZnCl_2 (50), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (38), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (500), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (50), $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (90), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2000), $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (92), $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (162), EDTA (1000) y 1 ml HCl (36%).

5.2.2.- BUFFER DE FOSFATOS

El buffer de fosfatos se utilizó durante la cuantificación de las aminas aromáticas, para estabilizar la anilina y 3-cloranilina y evitar su (auto)oxidación. La composición es la siguiente (g/L) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (10.86), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5.38) y ácido ascórbico (0.2).

5.3.- MÉTODOS

5.3.1 DETECCIÓN DE GRUPOS FUNCIONALES POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

Se llevó a cabo para determinar la presencia de grupos funcionales presentes en la superficie del material (OG). El procedimiento fue el siguiente: Por 24 h se secaron 500 µl de una suspensión de OG (6.2 mg/L) a una temperatura de 60 °C. La pastilla de KBr-OG se obtuvo mezclando una relación en peso de 100:1 de KBr (deshidratado) y OG, respectivamente; éste último previamente deshidratado y triturado en un mortero de agata. Posteriormente, se colocó la muestra en el portamuestra y se introdujo dentro del empastillador, se ejerció presión durante un periodo aproximado de 2 minutos. Antes de colocar el portamuestra con la pastilla KBr-OG en el equipo, se realizó un blanco con el portamuestras y una pastilla sólo con KBr.

El análisis se realizó en el equipo Thermo-Scientific FTIR (Nicolet modelo 6700) en el intervalo de 4000 a 400 cm⁻¹ utilizando 32 escaneos.

5.3.2.- DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA

Se analizó una concentración de OG de 30 mg/L suspendida en agua desionizada. Alrededor de 1.5 ml de suspensión se colocaron en la celdilla del equipo MICROTRAC Zetatrac NPA152-31^a para su análisis.

5.3.3.- DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL Z

Se analizó una concentración de grafeno de 30 mg/L disuelto en agua desionizada y en medio basal a diferentes pH's, desde 1 hasta 11 en ambos casos.

El pH se ajustó con HCl y NaOH 0.1N. Aproximadamente 1.5 ml de la solución se colocó en la celdilla del MICROTRAC Zetatrac NPA152-31A para su análisis.

5.3.4.- TITULACIONES BOEHM

La cuantificación de grupos oxigenados del OG se determinó por el método establecido por Boehm (1994), el cual se basa en titulaciones ácido-base. Las

Posteriormente, se prepararon experimentos control y tratamientos completos, descritos en la Tabla 3, para el análisis del ORP de sus respectivos componentes.

5.3.6.- REDUCCIÓN QUÍMICA DEL ROJO REACTIVO 2 Y DEL 3-CLORONITROBENCENO CON Na₂S COMO AGENTE REDUCTOR

Para determinar el efecto de la concentración de OG en la reducción del contaminante, se probaron diferentes concentraciones de OG (2.5, 5, 10, 25 y 50 mg/L) en el medio para ambos contaminantes. Los experimentos se llevaron a cabo en lote a un volumen final de 50 ml, por duplicado. Se utilizaron botellas serológicas de 60 ml de capacidad. Se realizaron controles en presencia sólo de OG y de Na₂S en el medio, para evaluar la capacidad de sorción del material y el efecto reductor del Na₂S respectivamente (Tabla 3). Cabe destacar que el control con OG (sin agente reductor) sólo se realizó a una concentración de 5 mg/L de OG en el medio basal (concentración que se utilizó en las cinéticas biológicas, con el fin de evitar fenómenos de sorción y de inhibición celular).

En un inicio se añadió medio basal, previamente burbujeado con una mezcla de gases N₂/CO₂ (80/20%), durante 10 min. Posteriormente las botellas se sellaron con tapones de hule y se les intercambió la atmósfera del espacio de cabeza con la mezcla de gases N₂/CO₂ (80/20%), durante 3 min. A continuación en una cámara anaerobia con una atmósfera de H₂/N₂ (4%/96%) para evitar la presencia de O₂ en nuestro sistema, se añadió el Na₂S a una concentración final de 2.6mM (aproximadamente 1.5 mM de Na₂S son necesarios para reducir 0.5 mM de 3CNB y 1 mM Na₂S son necesarios para reducir 0.5mM de RR2). Las botellas se incubaron en agitación (120rpm) y 25 °C por 24 h. Pasado el periodo de pre-incubación, se agregó el contaminante a una concentración de 0.5 mM en una cámara anaerobia con una atmósfera de H₂/N₂ (4%/96%) para evitar la presencia de O₂.

Tres veces al día se tomaron 100 µl de muestra la cual se diluyó en 1.9 ml de medio basal, en una celda de cuarzo, para medir la absorbancia fotométricamente en un espectrofotómetro UV-Vis Termo Spectronic modelo Aqua Mate a una

longitud de onda de 539 nm y 265 nm para el rojo reactivo 2 y el 3-cloronitrobenceno, respectivamente.

Tabla 3. Descripción de los experimentos realizados en la reducción química del RR2 y 3CNB.

Tratamiento	Descripción	Experimento
RR2/3CNB	Contaminante	Control sin donador de electrones ni mediador redox
Na₂S	Sulfuro + Contaminante	Control sin mediador redox
OG (5mg/L)	Óxido de grafeno® + Contaminante	Control sin donador de electrones
RR2/3CNB+Na₂S+OG	Contaminante + Sulfuro + Óxido de grafeno®	Tratamiento completo

Contaminante= RR2 o 3CNB.

5.3.7.- REDUCCIÓN BIOLÓGICA DEL ROJO REACTIVO 2 Y DEL 3-CLORONITROBENCENO EN UN AMBIENTE METANOGENICO Y SULFATO-REDUCTOR

Para los experimentos de reducción biológica del RR2 y del 3CNB con lodo metanogénico y sulfato-reductor, se realizaron una serie de experimentos descritos en la Tabla 4 y 5, cada uno por triplicado.

Tabla 4. Descripción de los experimentos realizados en la reducción biológica del RR2 y 3CNB, con lodo metanogénico.

Tratamiento	Descripción	Experimento
RR2/3CNB + Biomasa	Contaminante + Biomasa metanogénica	Control metanogénico sin mediador redox
RR2/3CNB + Biomasa + Grafeno	Contaminante + Biomasa metanogénica + óxido de grafeno®	Tratamiento completo
Biomasa estéril + Grafeno	Contaminante + Biomasa metanogénica estéril + óxido de grafeno®	Control metanogénico con donador de electrones
Biomasa estéril	Contaminante + Biomasa metanogénica estéril	Control metanogénico estéril sin donador de electrones

Contaminante= RR2 o 3CNB.

Tabla 5. Descripción de los experimentos realizados en la reducción biológica del RR2 y 3CNB, con lodo sulfato-reductor.

Tratamiento	Descripción	Experimento
RR2/3CNB + Biomasa	Contaminante + Biomasa sulfato-reductora	Control sulfato-reductor sin mediador redox
RR2/3CNB + Biomasa + Grafeno	Contaminante + Biomasa sulfato-reductora + óxido de grafeno ®	Tratamiento completo
Biomasa estéril + Grafeno	Contaminante + Biomasa sulfato-reductora estéril + óxido de grafeno ®	Control sulfato-reductor estéril con donador de electrones
Biomasa estéril	Contaminante + Biomasa sulfato reductora estéril	Control sulfato-reductor estéril sin donador de electrones

Contaminante= RR2 o 3CNB.

Los experimentos se llevaron a cabo en botellas serológicas de 60 ml por triplicado, que contenían 0.5 g/l de OG, 1 g SSV/L del inóculo previamente descrito en la sección 5.1.6, el cual fue disgregado con una tamiz de acero inoxidable de 12" de diámetro y 425 micrones de apertura. Las botellas para ambos tratamientos se sellaron con tapones de hule y se les intercambiaron la atmósfera del espacio de cabeza con la mezcla de gases N₂/CO₂ (80/20%), durante 3 min. Posterior a ello comenzó el periodo de pre-incubación, con la finalidad de estabilizar y aclimatar la biomasa a las condiciones establecidas. En dicho periodo se añadió 1g DQO/L de etanol y lactato de sodio (0.5/0.5 en términos de DQO) y para los experimentos con biomasa sulfato-reductora se inyectó 1g SO₄⁻²/L como sulfato de sodio. Posteriormente, ambos tratamientos (metanogénico y sulfato-reductor), se incubaron en agitación constante (120 rpm) a 30 °C por 48 h. Terminado el periodo de pre-incubación, se agregó un pulso 1g DQO/L de etanol-lactato de sodio (0.5/0.5 en términos de DQO) en ambos tratamientos y para el ambiente sulfato-reductor además 1g SO₄/L como sulfato de sodio. Finalmente se inyectó el contaminante a una concentración de 0.5mM ± 0.03 de RR2 ó 0.5 mM ± 0.2 de 3CNB).

Se realizaron experimentos control con biomasa estéril con y sin OG. La biomasa se esterilizó en autoclave 2 veces consecutivas.

Con la finalidad de dar seguimiento a la reducción del contaminante se tomaron alícuotas de 100 μ l cada hora y media en el caso de la biomasa sulfato-reductora y tres veces al día para la biomasa metanogénica. La muestra se diluyó en 1.9 ml de medio basal, en una celda de cuarzo, para medir la absorbancia fotométricamente en un espectrofotómetro UV-Vis Termo Spectronic modelo Aqua Mate a una longitud de onda de 539 nm y 265 nm para el rojo reactivo 2 y el 3-cloronitrobenceno respectivamente.

Tanto para la biomasa sulfato-reductora como la metanogénica se cuantificó la producción de metano una vez por día a lo largo de toda la cinética.

De igual forma, a lo largo de toda la cinética, en un ambiente sulfato-reductor, se extrajo un alícuota de 1 ml cada hora y media para cuantificar la producción de sulfuro y el consumo de sulfato por electroforesis capilar.

5.3.8.- DETERMINACIÓN DE METANO

Para la determinación del contenido de metano, se tomaron 100 μ l muestra de biogás producido en los reactores, se inyectaron en un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 6890N), equipado con un detector de conductividad térmica y una columna Hayesep D (Alltech, Deerfield, Illinois, USA) con las siguientes dimensiones: 3.048 m \times 3.18 mm \times 2.16 mm. Helio se utilizó como gas acarreador a un flujo de 12 ml min^{-1} . La temperatura del puerto inyección, del horno y del detector fue de 250, 60 and 250°C, respectivamente.

5.3.9.- DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO

La DQO se determinó utilizando el método descrito por métodos estándar (1998). Se colocaron 2ml de muestra previamente centrifugada (12000 rpm, 5 min) en tubos HACH. Posteriormente se añadió 2.8 ml de ácido sulfúrico-sulfato de plata (solución catalizadora) y 1.2 ml de solución digestora dicromato. Se mezclaron brevemente y colocaron en el digestor pre-calentado a 150°C por 2 h. Pasado el tiempo se retiraron del digestor y enfriaron a temperatura ambiente. Finalmente se midió la absorbancia fotométricamente en un espectrofotómetro UV-Vis Termo Spectronic modelo Aqua Mate, a una longitud de onda de 600 nm.

5.3.10.- CUANTIFICACIÓN DE SULFATO

El sulfato se determinó una vez que la muestra fue centrifugada (12000 rpm, 5 min) y filtrada (nitrocelulosa, 0.22 μ m) mediante electroforesis capilar (Agilent 1600A), usando un capilar de sílice fundida de 80.5 cm de longitud (72 cm de longitud efectiva) por 50 mm de diámetro interno. El electrolito contenía 5 mM de ácido dicarboxílico 2,6 piridina y 0.5 mM de bromocetiltrimetilamonio como modificador del flujo electro osmótico, a pH 5.6 ajustado con NaOH 1 M. La muestra se inyectó a una presión de 50 mbar por 6 segundos. El voltaje aplicado fue de - 25kV y la temperatura utilizada para el capilar fue de 20°C. La detección se realizó indirectamente mediante un detector de arreglo de diodos; la señal fue determinada a una longitud de onda de 350 nm con una referencia de 200 nm. El control del sistema, captura y análisis de los datos se llevaron a cabo mediante el uso del software ChemStation B.01.03.

5.3.11.- CUANTIFICACIÓN DE SULFURO DISUELTO

La determinación del sulfuro disuelto se determinó a partir del método de Cord-Ruwisch (1985). En tubos HACH se adicionaron 4 ml de solución de sulfato de cobre 5mM y HCl 50 mM, posteriormente en agitación vigorosa con vortex se añadieron 100 μ l de la muestra e inmediatamente se midió la absorbancia fotométricamente en un espectrofotómetro UV-Vis Thermo Spectronic modelo Aqua Mate a una longitud de onda de 480 nm.

5.3.12.- MEDICIÓN DE pH

El pH del efluente de ambos reactores se determinó a partir de una alícuota de aproximadamente 10 ml a temperatura ambiente, empleando el potenciómetro Thermo Electron Corporation Orion 4 Star.

5.3.13.- CUANTIFICACIÓN DE ANILINA

La cuantificación del subproducto de degradación del RR2, anilina, se realizó por HPLC. El aparato está equipado con dos columnas de fase reversa Synergi

4uHydro-RP80A (250 · 4.60 mm, 4 micron) de Phenomenex. La fase móvil, estaba compuesta por 60% de agua desionizada y 40% de acetonitrilo, inyectado a un flujo de 1 ml min⁻¹. La anilina se detectó utilizando un arreglo de diodos a 230 nm. Debido a que la anilina es un compuesto que se oxida muy rápidamente, se realizó el siguiente tratamiento de la muestra para preservar su integridad a lo largo de toda la manipulación y medición. Primeramente, se burbujeó el buffer de fosfatos con N₂ (99.9%) de 5 a 10 min. Pasado el tiempo, sin dejar de burbujear el buffer con N₂, se colocó una alícuota de 800 µl en un tubo eppendorf de 1.5 ml (una vez colocado el buffer en el tubo eppendorf, este se cerró). Posteriormente, el tubo eppendorf se abrió ligeramente y se añadieron 600 µl de muestra al buffer de fosfatos, descrito anteriormente, rápidamente se cerró y se mezcló manualmente. Evitando la menor exposición de la solución al ambiente, se filtró la muestra con filtros de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.22 µm; se colocó 1 ml de muestra en viales de vidrio de boca ancha, para su inmediato análisis en el equipo de HPLC. Para las muestras con biomasa, antes del proceso de filtración, la muestra se centrifugó a 13000 rpm por 5 min con el fin de eliminar la biomasa en suspensión y evitar un taponamiento del filtro. Es muy importante destacar que todos los pasos anteriores se hicieron lo más rápido posible debido a la inestabilidad del compuesto al exponerse al aire.

5.3.14.- CUANTIFICACIÓN DE 3-CLOROANILINA

La cuantificación del subproducto de degradación del 3CNB, 3CA, se realizó por HPLC. El equipo posee las mismas especificaciones descritas en el apartado 5.3.13.

Primeramente, se filtró (filtro de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0.22 µm) una alícuota del medio experimental para obtener un volumen final de 800 µl, la cual se colocó en viales de vidrio de boca ancha. Para las muestras con biomasa, antes del proceso de filtración, las muestras se dejaron sedimentar por 5 min, una alícuota se colocó en tubos eppendorf y se centrifugó a 13000 rpm por 10 seg con el fin de eliminar la biomasa en suspensión, evitar un taponamiento del filtro y evitar una adsorción del contaminante sobre el plástico.

A la par de la metodología anteriormente descrita, se burbujeó el buffer de fosfatos, descrito anteriormente, con N₂ de 5 a 10 min. Posteriormente se filtró el buffer de fosfatos con un filtro de nitrocelulosa de 0.22µm y se añadió aproximadamente un volumen de 400µl al vial de vidrio con la muestra del medio experimental previamente filtrada (800µl) para alcanzar un volumen final de 1.2ml (la adición del buffer se realizó lo más rápido posible debido a la inestabilidad del compuesto al exponerse al aire). Se mezcló manualmente e inmediatamente se realizó el análisis en el equipo de HPLC.

5.3.16.- DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE PRIMER ORDEN

Se empleó la constante de velocidad de primer orden “k”, obteniendo coeficientes de correlación mayores a 0.9 en todos los casos.

La constante de velocidad de primer orden se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$C_t = C_0 e^{-kt}$$

Donde:

C_t= concentración en el tiempo t.

C₀= concentración inicial en tiempo 0.

k= constante de velocidad de primer orden.

t= tiempo transcurrido.

6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1.- CARACTERIZACIÓN DEL ÓXIDO DE GRAFENO

Con la finalidad de anticiparse a la capacidad del OG como MR en la transformación reductiva del RR2 y 3CNB, se caracterizó con base en parámetros clave, reportados previamente en la literatura.

6.1.1.- GRUPOS FUNCIONALES

Los grupos funcionales presentes en la superficie del material se detectaron por la técnica de FTIR y se muestran en la Figura 12. Se observan bandas atribuibles a grupos funcionales de interés como quinona en un intervalo de 1400 a 1730 cm^{-1} , alrededor de 1500 cm^{-1} atribuibles a grupos aromáticos, entre 600-680 y 3300-3700 cm^{-1} debido a grupos cetonas y alcoholes; finalmente, entre 1040-1200 cm^{-1} atribuibles a grupos epoxi y alcoxi [Silverstein et al., 2005].

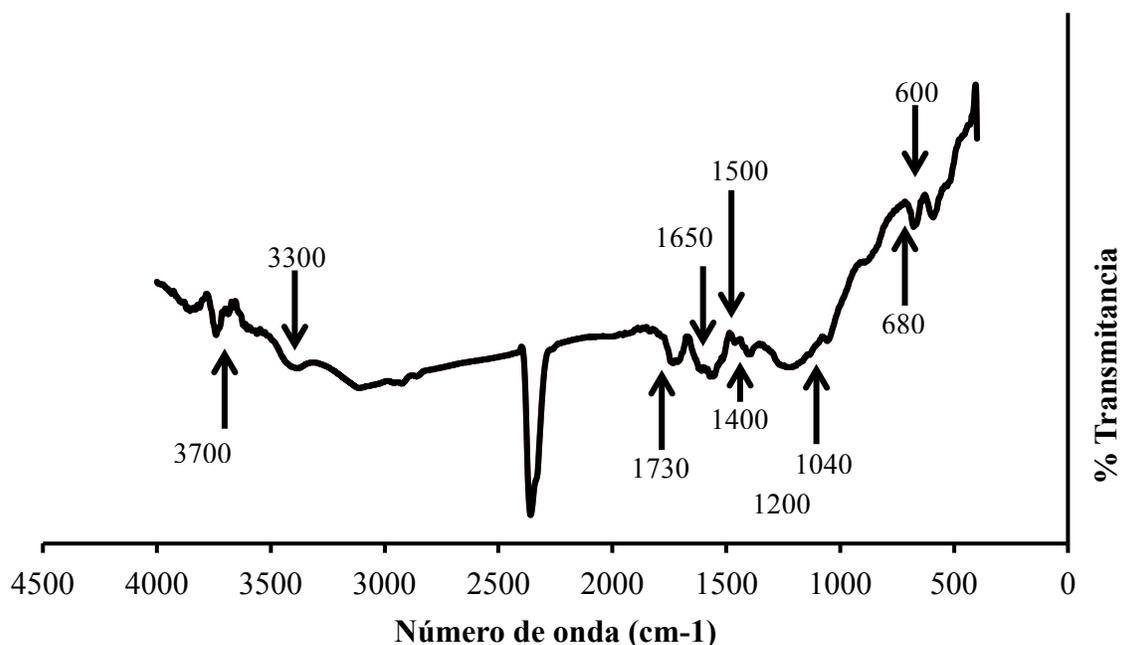


Figura 12. Espectro de infrarrojo para el óxido de grafeno. Flechas y número de onda, indican bandas atribuibles a diferentes enlaces de grupos funcionales oxigenados y aromáticos.

Complementariamente, se realizó una cuantificación de los grupos ácidos débiles (carbonilos, fenólicos, lactónicos y carboxílicos) presentes en la superficie del OG mediante el método de titulación ácido-base reportado por Boehm (1996). Los resultados se muestran en la Tabla 6, en donde los grupos predominantes son los carboxilos, lactónicos y carbonilos.

Tabla 6. Sitios activos presentes en la superficie del OG.

Grupo	Cantidad	Unidades
Carboxílicos	1.30	meq/g
Lactónicos	1.26	meq/g
Fenólicos	0.59	meq/g
Carbonilos	1.23	meq/g
TOTAL	4.39	meq/g

meq/g= miliequivalente/gramo

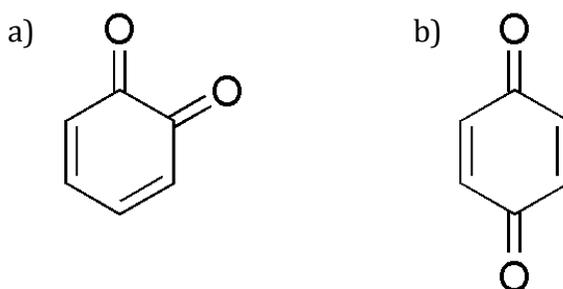


Figura 13. Estructura química de la (a) o-benzoquinona y (b) p-benzoquinona.

Como se puede observar en la Tabla 6, existe una gran cantidad de grupos funcionales oxigenados, incluso superior a los detectados en otros materiales a base de carbono reportados previamente como MR [Pereira et al, 2010; Amézquita-García et al, 2013; Gong et al, 2014]. El gran contenido de grupos funcionales oxidados, como los grupos quinona (Figura 13), reportados ampliamente por su capacidad como MR [Cervantes et al., 2001; van der Zee, 2002; dos Santos, 2005], fueron detectados de forma indirecta en el OG bajo la técnica de Boehm, 2 grupos carbonilo= 1 grupo quinona (Tabla 6). Sin embargo, la presencia de dichos grupos se comprobó por la técnica de FTIR al detectar

bandas específicas atribuidas a grupos quinona (Figura 12). Se espera que estos grupos influyan de manera importante en la capacidad como MR del OG.

Se ha sugerido que los grupos carboxilo podrían participar en la transferencia de electrones; sin embargo, la energía necesaria para transferir electrones en realidad podría romper los enlaces (en moléculas simples) inhibiendo la transferencia de electrones [Amezquita-García et al., 2013]. De igual, se ha reportado la capacidad de transferir electrones de los grupos lactona en soluciones ácidas; sin embargo, en soluciones básicas ($\text{pH} > 7$), pH experimental 7.5, los anillos del grupo lactónico se abren dando lugar a grupos carboxilo y cetonas. Lo que significa que es poco probable que los grupos lactona y carboxilo actúen como MR en la transformación de los compuestos de estudio. Lo anterior coloca a los grupos quinona, como grupos predominantes en la transformación reductiva del RR2 y 3CNB [Amezquita-García et al., 2013].

Basado en la literatura, no es el único mecanismo que influiría sobre la reducción de los contaminantes, de igual forma, los átomos de carbono situados principalmente en los bordes de la lámina de OG, son átomos de carbono insaturados, que poseen electrones desapareados, los cuales le confieren la capacidad de transferir de electrones y/o de interactuar con otras especies. Se espera que de igual forma que los grupos oxidados, jueguen un papel importante en la reducción de los contaminantes [Bandosz, 2006; Heyun et al., 2013].

6.1.2.- CARGA SUPERFICIAL DEL MATERIAL

Los experimentos de reducción se llevaron a cabo a un pH inicial de 7.6 ± 0.5 . De acuerdo con la Figura 14, al pH de trabajo la carga superficial global del OG disperso en agua es negativa y positiva cuando se encuentra disperso en medio basal. La gran diferencia entre la carga superficial en agua (negativa) y en medio basal (positiva) se debe principalmente a la presencia de sales en el medio que interactúan con los diferentes grupos funcionales, disociados, presentes en la superficie del OG neutralizándolos, siguiendo la regla en la cual un grupo funcional de un pKa dado sólo puede ser neutralizada con una base que tiene un mayor valor de pKa [Bandosz, 2006]. Dicho lo anterior, el bicarbonato de sodio, sal que

se encuentra en altas concentraciones en el medio con un pKa de 6.4, neutraliza sólo los grupos carboxilo con un pKa entre 3-6 [Bandosz, 2006], debido a que los demás grupos funcionales presentes, lactónicos, fenólicos y carbonilos, poseen un pKa más alto que el bicarbonato de sodio, no se cumple para ellos la regla anteriormente mencionada. De igual forma, los iones sodio y bicarbonato, pueden adsorberse entre los espacios adyacentes del material, neutralizando la carga neta del material [Cooney, 1999].

Por otro lado, teniendo en cuenta que los compuestos nitroaromáticos y azo aromáticos son moléculas electronegativas [Amezquita-García et al., 2013] y el OG electropositivo, se espera una atracción entre ambos componentes, la cual podría ser una ventaja para catalizar su transformación. Así mismo, la presencia de grupos quinona en la superficie del material, como se demostró anteriormente, podría beneficiar en el proceso redox, debido a la transformación reversible de los grupos quinona a hidroquinona (grupos electropositivos) o la formación de complejos de aniones con HS^- que favorezcan de igual forma la interacción entre ambos compuestos (contaminante y OG) [Amezquita-García et al., 2013].

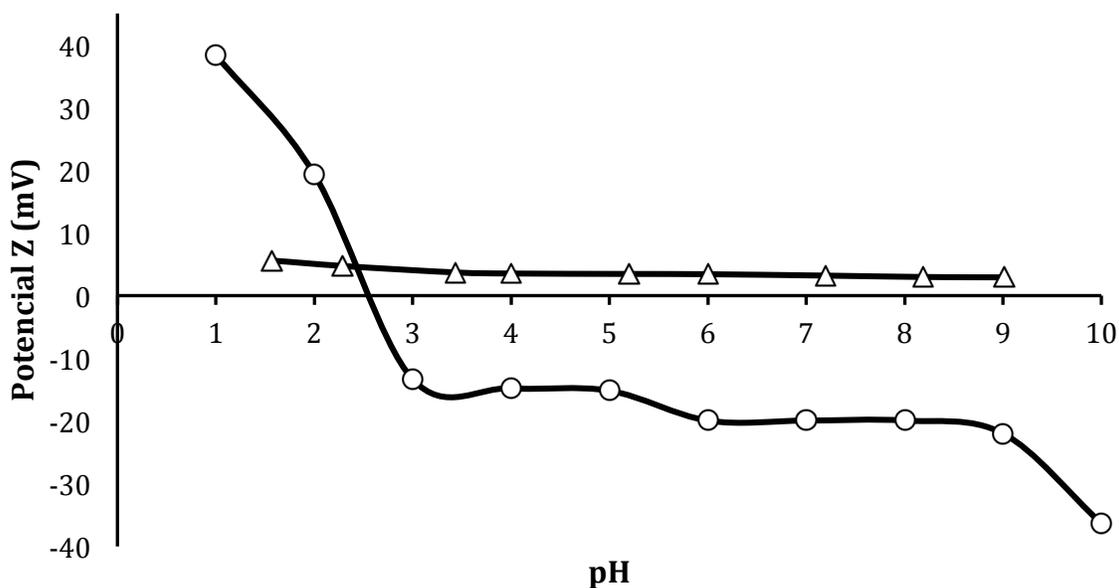


Figura 14. Carga superficial del OG a diferentes pH. Círculos, indican la distribución de carga en agua. Triángulos, indican la distribución de carga en medio basal.

6.1.3.- TAMAÑO DE PARTÍCULA

Como se muestra en la Figura 15, las partículas del OG presentan una variabilidad entre 300 y 1000 nm, teniendo una mayor proporción de partículas entre 500 y 600 nm.

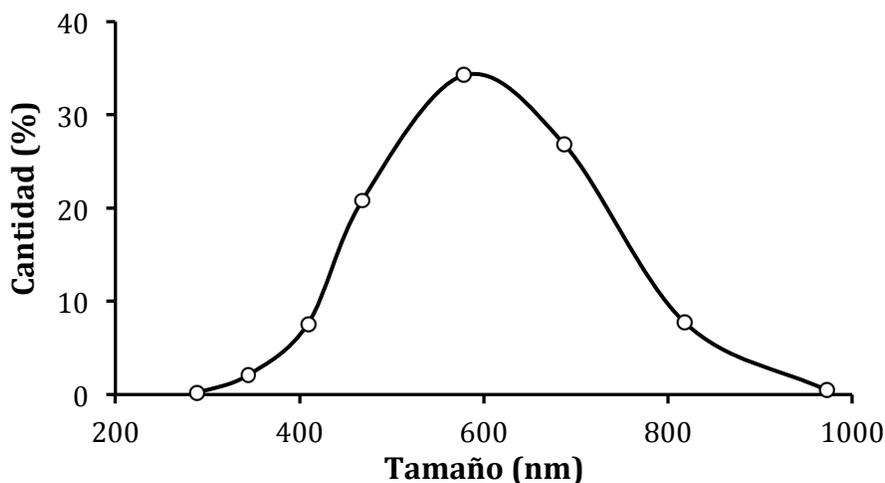


Figura 15. Distribución de tamaño de partícula del OG.

Conocer el tamaño de las partículas con las que se trabaja resulta de gran interés. Estudios han reportado un efecto antimicrobiano del OG dependiente del tamaño de la lámina. Trabajos como los de Liu et al., (2013), en donde tuvieron 70% de pérdida de viabilidad de cultivos puros de *E. coli* en presencia de un tamaño promedio de partícula de OG de 300 nm; al igual que el trabajo de Liu et al., (2012), en donde encontraron una dependencia entre la actividad antibacteriana del OG y el tamaño de partícula del mismo, evidencian lo anterior. Posibles interacciones entre el OG y la bacteria se podrían llevar a cabo como se muestra en la Figura 16, generando un estrés físico sobre la bacteria, al igual que una toxicidad indirecta promoviendo la generación de especies reactivas de oxígeno, que desencadenen en una apoptosis celular [Bianco et al., 2013].

No sólo el tamaño de partícula juega un papel importante en la actividad antibacteriana del OG; de igual forma, se ha reportado una estrecha relación entre dosis del OG (concentración entre 50 y 300 mg/l) y una pérdida de viabilidad celular en cultivos mixtos [Ahmed et al., 2013]. Sin embargo, estudios como los de Ruiz et al., (2011), en donde obtuvieron un mayor crecimiento de cultivos puros de

E. coli en presencia de OG (25 $\mu\text{g/ml}$) detectando la formación de sustancias exopoliméricas que pudieron fungir como defensa ante el posible efecto del OG, se contraponen con los estudios mencionados anteriormente.

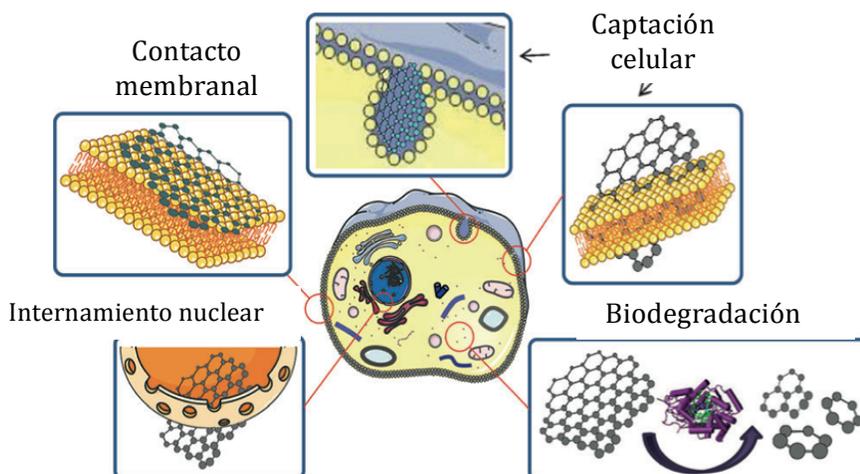


Figura 16. Posibles interacciones del OG a nivel celular [Bianco et al., 2013].

Si bien es cierto, las características fisicoquímicas del OG parecen jugar un papel importante en la capacidad antimicrobiana que puedan llegar a alcanzar, no obstante, también es cierto que existe una falta de evaluación a fondo de la influencia del OG en la morfología, viabilidad, integridad de la membrana y la apoptosis celular en diferentes comunidades microbianas [Bianco et al., 2013].

6.1.4.- POTENCIAL ÓXIDO REDUCCIÓN (ORP) DEL ÓXIDO DE GRAFENO

El ORP es un parámetro importante que afecta a las vías metabólicas, el cual mide la tendencia de una especie a ganar electrones (a reducirse). El proceso de reducción de colorantes azo y compuestos nitroaromáticos se basa en reacciones de oxidación-reducción en el que los compuestos actúan como aceptor final de electrones. La transferencia de electrones dependerá de la diferencia de los potenciales redox entre los donadores y aceptores de electrones; por lo tanto, para lograr una efectiva reducción de los contaminantes, condiciones con un bajo potencial redox (E^0) son deseables en condiciones anaerobias [Ozdemir et al.,

2013]. Los resultados de la determinación del E^0 de las diferentes especies involucradas en el sistema biológico y químico se muestran en la Figura 17 y 18.



Figura 17. Potencial óxido-reducción de las diferentes especies involucradas en la reducción biótica o abiótica del colorante RR2. pH=7, T=30°C.

**El valor del E^0 del donador primario de electrones se obtuvo del libro "Environmental Biotechnology: Principles and Applications, Rittmann & McCarty.*



Figura 18. Potencial óxido-reducción de las diferentes especies involucradas en la reducción biótica o abiótica del compuesto nitroaromático 3CNB. pH=7, T=30°C.

**El valor del E^0 del donador primario de electrones se obtuvo del libro "Environmental Biotechnology: Principles and Applications, Rittmann & McCarty.*

Tomando en cuenta que los electrones fluyen espontáneamente en el sentido de los E^0 crecientes, es decir del más negativo (donador primario de electrones) al más positivo (aceptor final de electrones), la transferencia de electrones, aparentemente, no será un paso limitante para la reducción de ambos contaminantes.

6.2.- EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ÓXIDO DE GRAFENO EN LA REDUCCIÓN DEL RR2 Y 3CNB

Primeramente, un fenómeno observado a mayor concentración de OG en el medio, fue una floculación entre las láminas de grafeno, dando lugar a la formación de estructuras gráficas, como se esquematiza en la Figura 19. Los parches hidrofóbicos del material, zonas no oxidadas, interaccionaron entre sí,

debido a fuerzas débiles de van der Waals y por los orbitales π de los átomos de carbono, promoviendo la formación de estructuras amorfas [Bandosz, 2006].

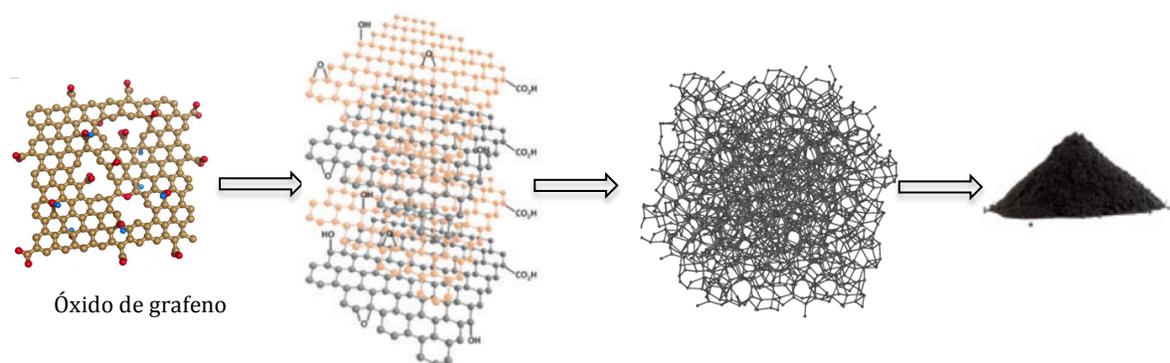


Figura 19. Esquematación de la formación de estructuras gráficas debido a las altas concentraciones de OG en el medio.

El fenómeno de floculación se apreció a simple vista, observándose una mayor formación de gránulos negros, estructuras gráficas, conforme aumentó la concentración del OG en el medio, como se muestra en la Figura 20.

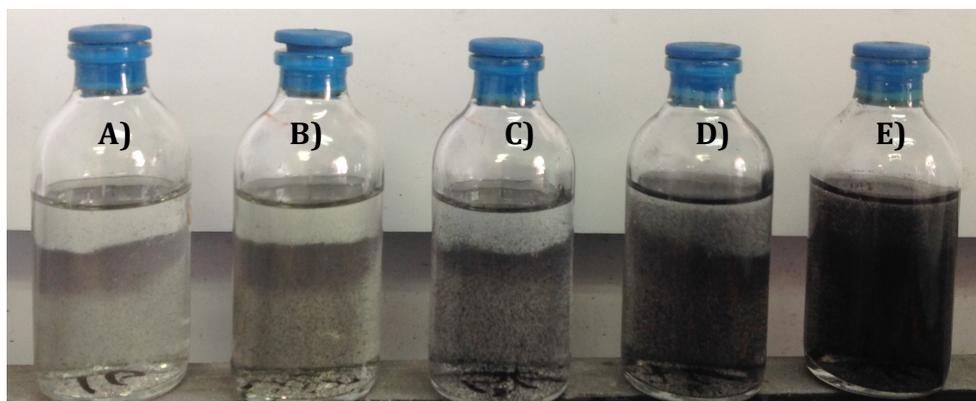


Figura 20. Formación de agregados de carbono a diferentes concentraciones de OG en el medio. A) 2.5mg/L OG, B) 5mg/L OG, C) 10 mg/L OG, D) 25 mg/L OG y E) 50 mg/L OG.

Se probaron diferentes concentraciones de OG para reducir el RR2 y 3CNB, con el fin de observar un posible aumento en las tasas de reducción de ambos contaminantes, lo anterior debido a un aumento de grupos funcionales presentes

en el medio, o de igual forma observar los posibles efectos sobre la reducción del contaminante debido a las interacciones entre el propio material. Los resultados se muestran en la Figura 21.

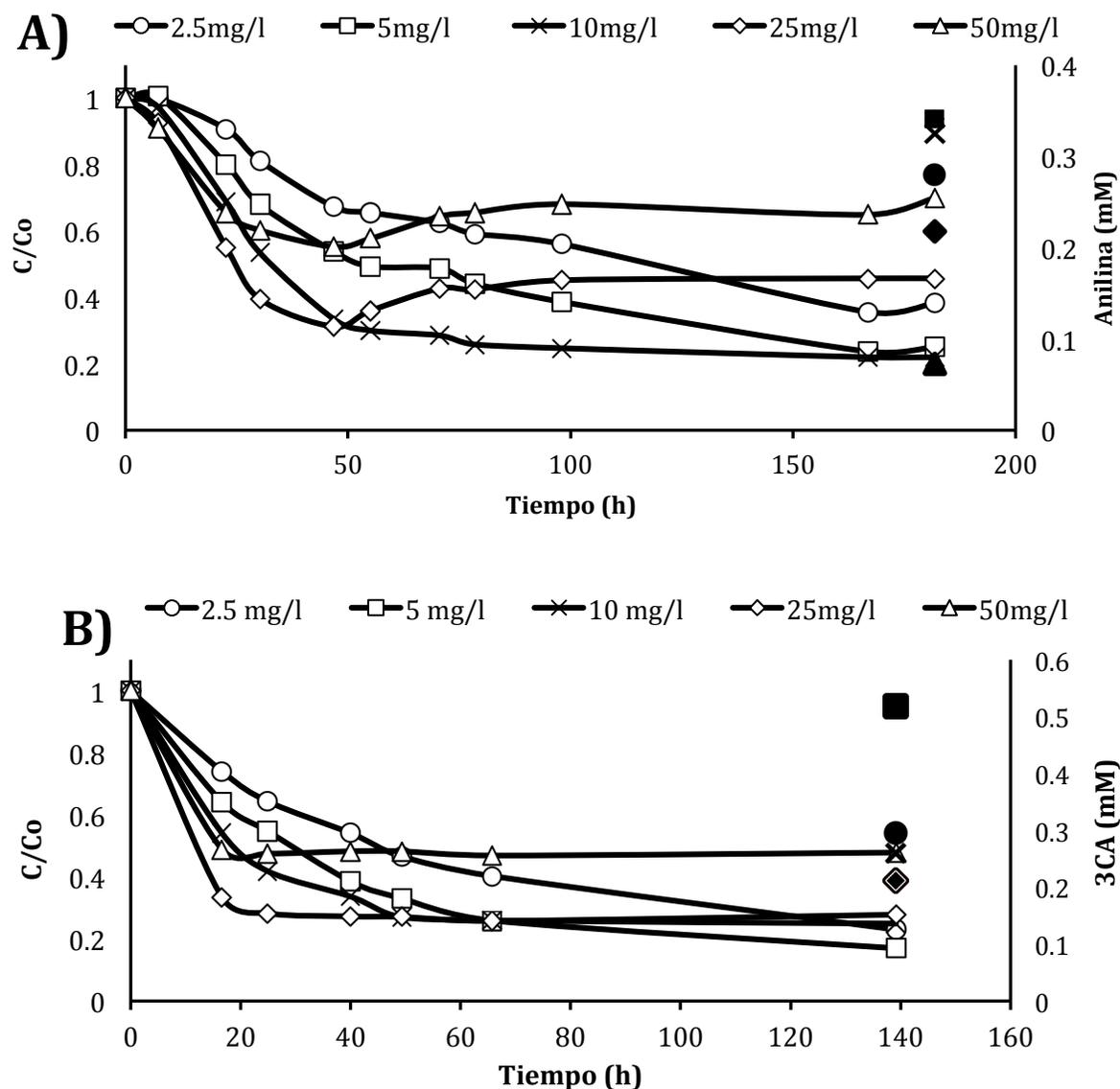


Figura 21. Cinética de Reducción Química a diferentes concentraciones OG en el medio. T= 25°C. A) 0.5mM RR2. B) 0.5mM 3CNB. Símbolos negros representan la concentración de anilina y 3CA en el medio al finalizar la cinética.

En la cinética de reducción del colorante RR2, se obtuvo en conjunto una mayor tasa y eficiencia de reducción a una concentración de OG de 10 mg/L (Tabla 7).

Para el compuesto 3CNB, se obtuvo en conjunto una mayor tasa y eficiencia de reducción a una concentración de OG de 5 mg/L (Tabla 8).

Tabla 7. Eficiencia de reducción y constante de primer orden para la reducción química del RR2 a diferentes concentraciones de OG.

Concentración de OG (mg/L)	k (h⁻¹)	Eficiencia de reducción (%)
2.5	0.00705 ± 0.0005	68.24
5	0.01395 ± 0.001	76.45
10	0.02375 ± 0.0002	77.97
25	0.02708 ± 0.0009	54.23
50	0.01356 ± 0.0004	30.00

El valor de k se calculó asumiendo una reacción de primer orden. t= 55h.
OG= óxido de grafeno, k= constante de primer orden.

Tabla 8. Eficiencia de reducción y constante de primer orden para la reducción química del 3CNB a diferentes concentraciones de OG.

Concentración de OG (mg/L)	k (h⁻¹)	Eficiencia de reducción (%)
2.5	0.0138 ± 0.0012	76.98
5	0.0206 ± 0.0028	83.01
10	0.0275 ± 0.0108	75.05
25	0.0529 ± 0.0124	72.17
50	0.0317 ± 0.0014	52.13

El valor de k se calculó asumiendo una reacción de primer orden. t= 66h.
OG= óxido de grafeno, k= constante de primer orden.

El aumento en la constante de primer orden a concentraciones crecientes de OG, como se observa en las Tablas 7 y 8, se debió al aumento de concentración de sitios activos disponibles y accesibles para interactuar primeramente con el agente reductor y posteriormente incidir sobre la reducción del contaminante. Sin embargo, la constante de primer orden disminuyó a concentraciones altas de OG, lo anterior debido a que los grupos funcionales ya no estuvieron tan accesibles al agente reductor y por ende a llevar a cabo la reducción del contaminante. Como se discutirá más adelante en las secciones 6.3.1.1 y 6.3.2.1, el OG por sí solo, no

incidió sobre la reducción de ambos contaminantes ni sobre la adsorción de los mismos.

Por otro lado, como se observa en la Figura 21A, aproximadamente a las 45 h a concentraciones de 25 y 50 mg/L de OG, hay un aumento de concentración del colorante RR2 en el medio. Lo anterior se debe a fenómenos de adsorción-desorción entre el contaminante y sus productos de reducción (Figura 6) sobre los sitios activos del material, y a continuación se explica más claramente.

Primeramente hay que recordar que cuando se pone en contacto una cantidad de adsorbente (OG floculado) con un volumen dado de un líquido que contiene un soluto adsorbible, en este caso el contaminante, la adsorción-desorción se produce hasta que se alcanza el equilibrio, es decir que el mismo número de moléculas que se adsorbe se desorbe, a lo largo del tiempo, sin modificar la concentración en el medio. Aunado a ello, la presencia de otros solutos adsorbibles, como los productos de reducción (Figura 6), implica invariablemente la competencia por los sitios activos de adsorción [Cooney, 1999].

En la búsqueda del equilibrio en la solución, los productos de reducción del colorante (Figura 6), pudieron tener una mayor afinidad por los sitios activos, adsorbiéndose una mayor cantidad de los mismos o desplazando las moléculas ya adsorbidas del colorante, hacia el medio. De igual forma una quimisorción entre los productos de reducción y los sitios activos del material se pudo llevar a cabo, en donde interacciones no reversibles, es decir formación de enlaces químicos se vieron involucrados entre ambos componentes; de igual forma pudieron quimisorberse en más de un sitio activo, disminuyendo la disponibilidad de los sitios para llevar a cabo la adsorción-desorción de las moléculas restantes en la solución para alcanzar el equilibrio. Finalmente a las 180 h, Figura 21A, la solución llega al equilibrio, es decir el mismo número de moléculas que se adsorbe se desorbe. Por el contrario, en la cinética de reducción del 3CNB, no se observa en ningún punto un aumento en la concentración del contaminante en el medio, Figura 21B. Aparentemente se comportaron de manera similar, en el cual hubo un intercambio 1 a 1 en los sitios activos para alcanzar el equilibrio. Lo anterior se puede atribuir a la similitud en cuanto a estructura química, número y tipo de

grupos funcionales (Figura 7), los cuales interaccionaron de manera semejante con los sitios activos.

Basándonos en los resultados obtenidos y con el fin de evitar fenómenos de adsorción y de inhibición hacia las diferentes comunidades microbianas [Ahmed et al., 2013], en los experimentos de reducción biológica, tanto en un ambiente metanogénico y sulfato-reductor, se utilizó una concentración de OG de 5 mg/L en el medio.

6.3.- TOXICIDAD DEL OG SOBRE COMUNIDADES BACTERIANAS

Cabe resaltar que los experimentos de reducción biológica se realizaron bajo condiciones metanogénicas y sulfato-reductoras. Lo anterior debido a que condiciones metanogénicas se encuentran en la mayoría de los tratamientos anaerobios convencionales de aguas residuales. Y condiciones sulfato-reductoras, debido a la alta concentración de SO_4^{-2} presente en efluentes ricos en ambos contaminantes (colorantes azo y compuestos nitroaromáticos).

Contrario a lo reportado en la literatura [Liu et al., 2012; Liu et al., 2013, Ahmed et al., 2013], el OG no ejerció un efecto tóxico sobre el metabolismo celular en ambos tratamientos (metanogénico y sulfato-reductor), ya que tanto el consumo de sulfato como la producción de metano se llevaron a cabo durante el periodo de pre-incubación (lodo expuesto a OG, pero sin el contaminante adicionado). La nula toxicidad del OG se podría atribuir (1) a las bajas concentraciones del material utilizadas en los experimento; (2) el OG puede inducir la formación y secreción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), las cuales sirven como una barrera entre la bacteria y el OG y/o (3) los componentes naturales en la biomasa que sirven como una barrera entre la bacteria y el material, y así en conjunto evitar o disminuir el daño a la misma [Wang et al., 2013 y Ruiz et al., 2013].

6.4.- EXPERIMENTOS DE REDUCCIÓN

6.4.1.- REDUCCIÓN DEL COLORANTE ROJO REACTIVO 2

6.4.1.1.- REDUCCIÓN QUÍMICA

Como se mencionó anteriormente, en tratamientos anaerobios convencionales, la combinación de procesos bióticos y abióticos da lugar a la reducción del contaminante. Agentes reductores químicos, como el sulfuro, son muy comunes en sistemas de tratamiento de aguas residuales y son capaces de reducir químicamente a los colorantes azo [van der Zee et al., 2002].

Los resultados de la cinética de reducción química se muestran en la Figura 22. En el experimento control, incubado sólo con OG (OG+RR2), no se detectó una pérdida de color en el medio ni la presencia del subproducto de reducción del RR2 (anilina). Por el contrario, el agente reductor por sí solo (RR2 + Na₂S), incidió sobre la reducción del contaminante, logrando alrededor de un 28% de reducción al cabo de 180 h, comprobándose la reducción del colorante al detectar 0.17 mM de anilina en el medio. Finalmente, en el tratamiento completo (OG+RR2+Na₂S), claramente se observa un efecto sobre la reducción del contaminante lográndose alrededor de un 99% de reducción del colorante al cabo de 180 h, detectándose hasta 0.2 mM de anilina en el medio. La baja concentración de anilina recuperada se debió a la gran inestabilidad que presenta dicho compuesto. Martínez et al. (2013), mencionan que es todo un reto la cuantificación de dicho subproducto, debido a la inestabilidad del mismo durante el muestreo y el análisis; recomiendan el uso de un agente reductor (ácido ascórbico) en el buffer de dilución para evitar o disminuir la (auto) oxidación de la misma y así poder detectar una mayor concentración del subproducto.

Los resultados se pueden comparar a los reportados por Pereira et al. (2010), los cuales utilizaron 0.3 mM de RR2 hidrolizado, y 0.1 g/L de carbón activado como mediador redox, obteniendo un 55% de reducción del colorante al paso de 2.5 días. Por el contrario, en el presente estudio se obtuvo un 60% de reducción del RR2 al cabo de 2.5 días, utilizando RR2 sin hidrolizar a una concentración de 0.5

mM. Calculando los mmol de RR2 reducido/mg de MR para ambos estudios, los resultados muestran un mejor rendimiento por mg de material en el presente estudio, obteniendo 0.06 mmol de RR2 reducido/mg de OG versus 0.00165 mmol de RR2 reducido/mg de carbón activado en el estudio de Pereira et al. (2010), al cabo de 2.5 días en ambos casos. Sin embargo, la constante de primer orden (Tabla 10) fue 2.5 veces menor que la reportada por Pereira et al. (2010). Lo anterior se puede atribuir a una mayor concentración de RR2 utilizada, al potencial redox del material, no especificado en el artículo, y a la falta de hidrólisis del contaminante el cual lo hace más susceptible a la reducción debido a que no posee grupos cloruro que demanden electrones para deshalogenar el grupo antrazina del RR2 [dos Santos 2005].

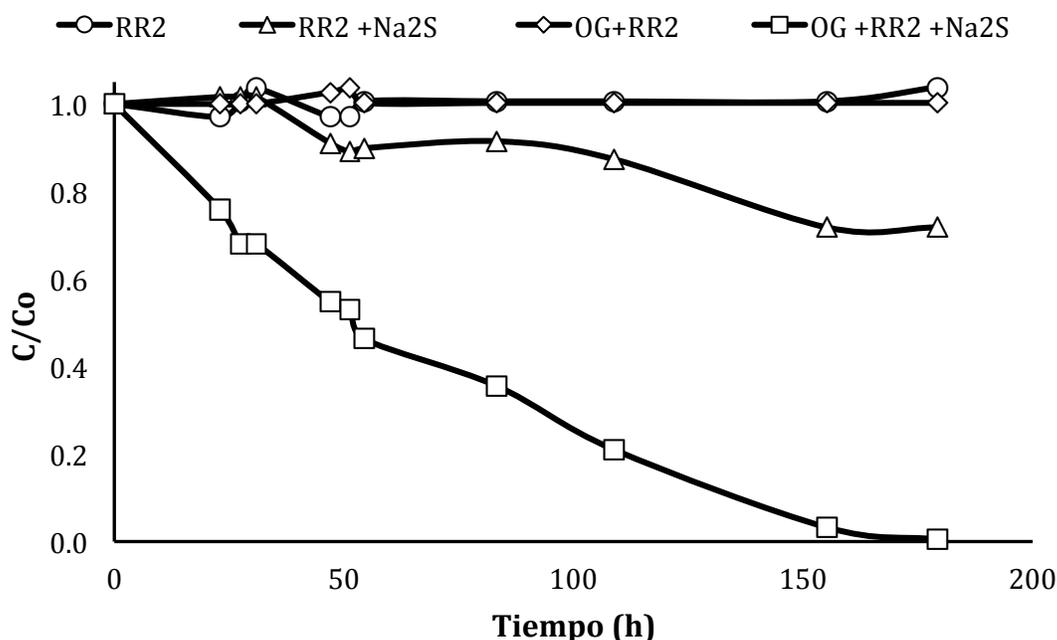


Figura 22. Cinética de reducción química del RR2 en presencia del OG y Na₂S como agente reductor. 5mg/L OG; 0.5 mM RR2; T= 25°C.

RR2=rojo reactivo 2, OG= óxido de grafeno, T=temperatura y Na₂S= sulfuro de sodio.

Hasta el momento se ha comprobado la efectiva funcionalidad como MR del OG en la reducción química del RR2, aumentando la eficiencia de reducción y la constante de velocidad de reducción del colorante RR2 hasta en un orden de

magnitud respecto al tratamiento control (Na₂S) sin OG, como se observa en la Tabla 9, lo anterior atribuido principalmente a la basta diversidad de grupos funcionales oxigenados con capacidad para aceptar y donar electrones.

Tabla 9. Eficiencia de reducción y constante de velocidad de primer orden (k) para la reducción química del RR2 bajo diferentes condiciones.

Tratamiento	k (h ⁻¹)	Eficiencia de reducción (%)	Impacto del OG en la k
RR2	0.00047 ± 0.0007	0	
Na₂S	0.0022 ± 0.0012	28	
OG	0.00038 ± 0.0002	0	
RR2+Na₂S+OG	0.02067 ± 0.005	99	Aumentó 10 veces

El valor de k se calculó asumiendo una reacción de primer orden. t= 156 h.
RR2= rojo reactivo 2, Na₂S= sulfuro de sodio, OG= óxido de grafeno.

6.4.1.2.- REDUCCIÓN BIOLÓGICA

Comenzando con las cinética de reducción biológica para el RR2 con lodo metanogénico, los resultados se muestran en la Figura 23A. En controles incubados con biomasa estéril (proceso de esterilización por autoclave) con y sin OG, se observó una reducción aproximada del 5% en ambos casos, detectando hasta 0.06 mM de anilina en el medio, en ambos tratamientos. La reducción del colorante en un ambiente estéril se puede deber a (1) la presencia de coenzimas intracelulares térmicamente estables como la flavinas, con capacidad de actuar como MR acelerando las velocidades de reacción [Prato et al., 2013] y/o (2) a los agentes reductores naturales presentes en la biomasa como las formas reducidas de hierro y azufre tales como óxidos de hierro (II/III), carbonatos de hierro (II) y sulfuros de hierro (II) [Dunnivant et al., 1992], los cuales son capaces de reducir químicamente a los colorantes [Van der Zee et al., 2000]. Por otro lado, para el experimento control sin OG y con biomasa activa metanogénica (RR2+Biomasa), se detectó una reducción de la concentración del contaminante en el medio hasta de un 80%, lográndose detectar 0.35 mM de anilina. Finalmente, en el experimento completo (RR2+OG+Biomasa), se detectó una reducción en la concentración del colorante en el medio en un 99% al cabo de 200 h, detectándose 0.35 mM de anilina en el medio. Como se mencionó anteriormente,

la baja concentración de anilina recuperada se debe a la gran reactividad del compuesto (anilina) con el oxígeno.

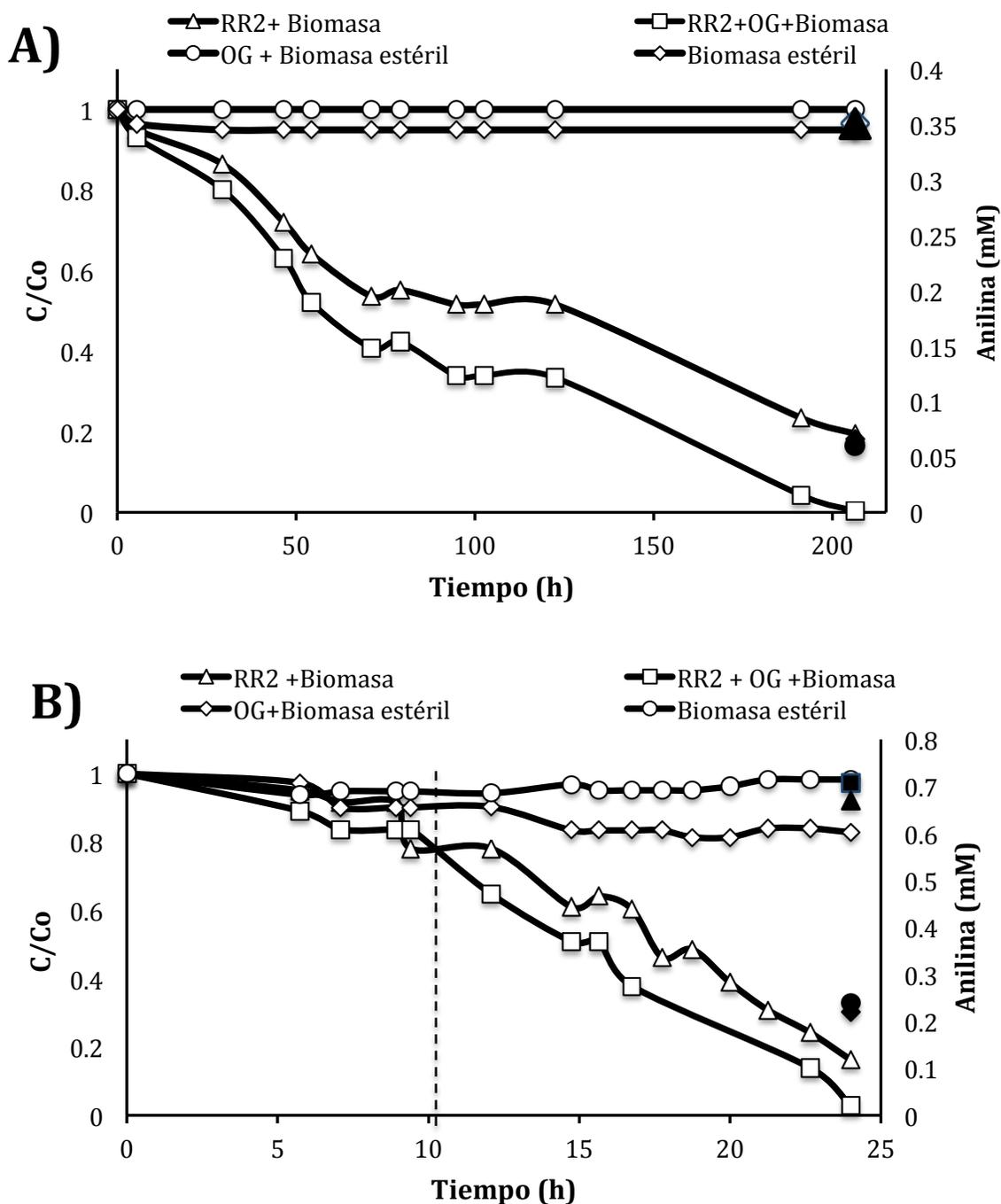


Figura 23. Cinética de Reducción Biológica para el RR2. T= 25°C. A) Biomasa metanogénica. B) Biomasa sulfato-reductora.

Símbolos negros representan la concentración de anilina al final de la cinética para cada tratamiento. La línea punteada indica el tiempo en el que se consumió un 50% de sulfato en el medio.

Se detectó una pobre actividad metanogénica durante el curso de la reducción del RR2 independientemente de la presencia o no de OG (Figura 24), lo que pone de manifiesto los efectos inhibitorios del colorante RR2 sobre las arqueobacterias metanogénicas, como ya se había observado previamente [Martínez et al. 2013]. Sin embargo, los aspectos toxicológicos no podrían ser el único aspecto que determine la falta de actividad metanogénica durante el curso de la reducción de RR2 por el lodo anaerobio evaluado. Ciertamente, estudios anteriores han indicado que los microorganismos metanogénicos son capaces de lograr la reducción de colorantes azoicos en cultivos puros, pero no acoplado a la producción de metano [Dos Santos et al., 2006]. Es decir, aparentemente hubo una competencia por los electrones disponibles, debido a la fermentación del etanol/lactato, entre la metanogénesis y la reducción del colorante azo.

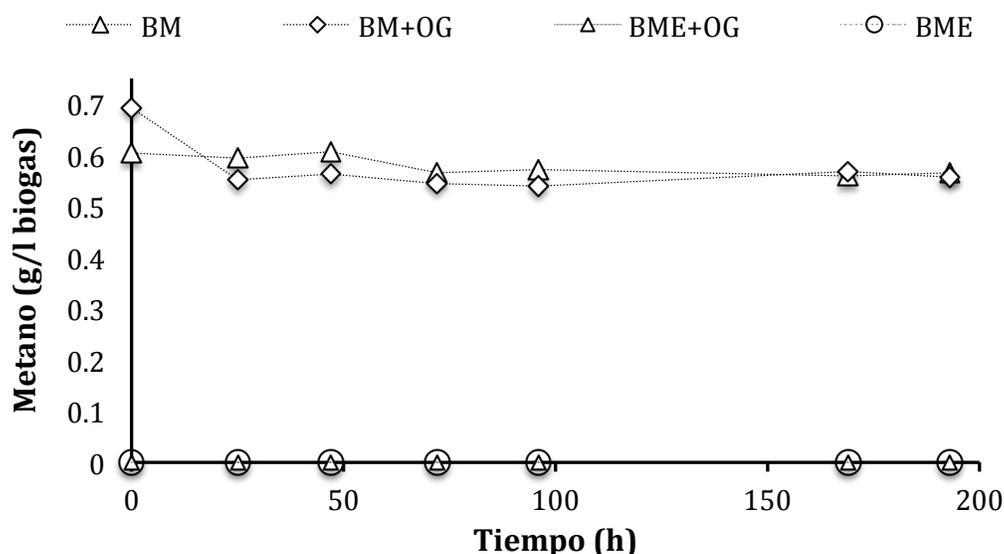


Figura 24. Perfil de producción de metano en el experimento de reducción biológica con lodo metanogénico. Donde BM=biomasa metanogénica, OG=óxido de grafeno, BME=biomasa metanogénica estéril.

El efecto de un ambiente sulfato-reductor se muestra en la Figura 23B. En los controles incubados con biomasa estéril con y sin OG (OG + Biomasa estéril y Biomasa estéril), se obtuvo una reducción del RR2 de hasta 20%, detectando hasta 0.2 mM de anilina en el medio. La reducción del colorante en un ambiente

estéril se puede atribuir a diferentes factores como (1) especies de sulfuro remanentes en la biomasa que incidieron directamente sobre la reducción del colorante; (2) coenzimas térmicamente estables como flavinas con capacidad redox, la cual se ha comprobado que en presencia de sulfuro biológico presenta mayores capacidades de reducción comparado con otras moléculas redox [Prato et al., 2013]; y/o (3) especies de sulfuro presentes en la biomasa que incidieron directamente sobre grupos funcionales del OG y posteriormente sobre la reducción del contaminante [Heyun et al., 2013]. Para los experimentos con biomasa activa sulfato-reductora con y sin OG (Biomasa+ OG y RR2+Biomasa) se obtuvo una reducción alrededor de un 98 y 82% respectivamente, en un periodo de 24 h, detectando hasta 0.5mM de anilina en el medio. Muy probablemente el sulfuro presente en la muestra ayudó a que la anilina no se auto-oxidara, por lo anterior es que se obtuvo un mejor rendimiento de recuperación de anilina respecto a un ambiente metanogénico.

La reducción del colorante en un ambiente sulfato-reductor se llevó a cabo en dos etapas. La primera etapa se llevó a cabo de 0 a 10h (Figura 23B), en el cual sólo se detectó un consumo de sulfato en el medio, alrededor de un 50% (Figura 25), posterior a ello se detectó una reducción adicional de sulfato durante la reducción de RR2, pero a una velocidad mucho menor en comparación con el período inicial de incubación (primeras 10 h). La reducción del colorante en esta etapa, fue comparable con las obtenidas en los controles (Biomasa estéril con y sin OG), atribuyéndole la reducción a especies de sulfuro remanentes y agentes reductores presentes naturalmente en la biomasa. Posterior a ello, comienza la segunda etapa, la reducción del RR2, en la cual el sulfuro biológico generado a partir de la reducción del sulfato, durante el período de incubación inicial (0-10h), fue el principal agente reductor que promovió el proceso de decoloración [Yoo et al. (2000) y Diniz et al (2002)], observándose hasta este punto, diferencias entre tratamientos (biomasa estéril y biomasa activa). La concentración de sulfuro no se pudo medir en presencia de RR2 debido a la interferencia colorimétrica en el método espectrofotométrico. Sin embargo, basado en la alta actividad sulfato-reductora observada, 6.2 mM y 4.8 mM de sulfuro se habría producido a partir de

la reducción de sulfato durante las primeras 10 h de incubación, en presencia y ausencia de OG, respectivamente. Las concentraciones de sulfuro calculados son inclusive más altas que la concentración de sulfuro presentes en la reducción abiótica de RR2 en presencia del OG (2,6 mM), lo que explica los valores superiores de k_{RR2} en el cultivo sulfato-reductor (0.135 h^{-1}) respecto a las incubaciones abióticas (0.021 h^{-1}). De igual forma a los experimentos desarrollados bajo condiciones metanogénicas, las comunidades metanogénicas se vieron inhibidas a lo largo de toda la cinética de reducción en condiciones sulfato-reductoras (Figura 25).

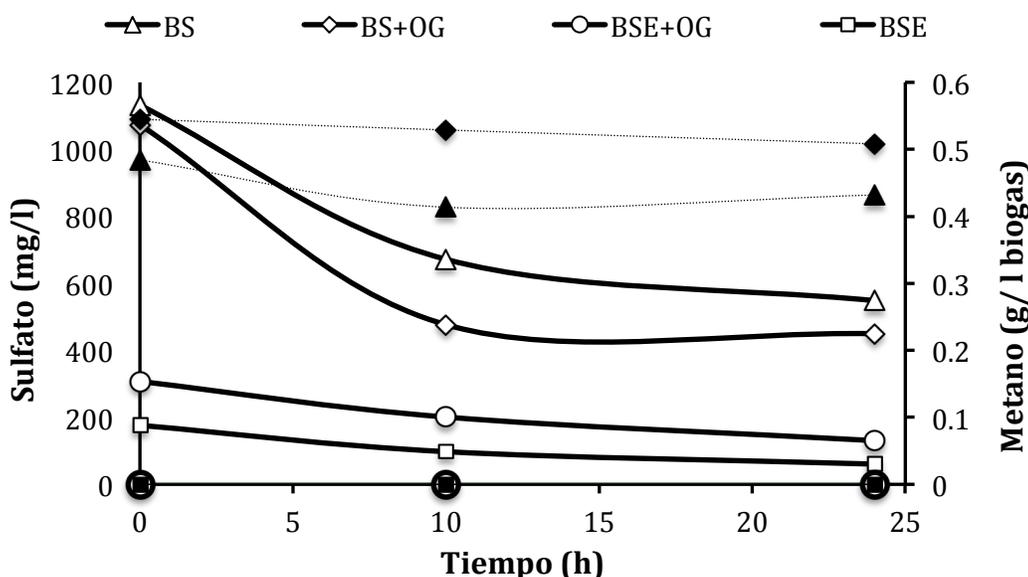


Figura 25. Consumo de sulfato en el tratamiento con lodo sulfato-reductor (Símbolos blancos) y perfil de producción de metano (Símbolos negros) a diferentes tiempos.

Donde BS=biomasa sulfato-reductora, OG= óxido de grafeno, BSE= biomasa sulfato-reductora estéril.

Los resultados descritos anteriormente comprueban que el OG, bajo condiciones metanogénicas y sulfato-reductoras, actúa como un efectivo MR promoviendo una mayor tasa de reducción del colorante RR2, como se observa en la Tabla 10, atribuible principalmente a los grupos funcionales oxigenados presentes en su superficie [Cervantes et al., 2001, Amezcua-García et al., 2013, Heyun et al., 2013].

Tabla 10. Eficiencias de reducción y constante de velocidad de primer orden (*k*) para la reducción biológica del RR2 bajo diferentes condiciones y tratamientos.

CONDICIONES METANOGENICAS			
Tratamiento	k (h⁻¹)	Eficiencia de reducción (%)	Impacto del OG en la k
Etanol/lactato	0.0075	80	
Etanol/lactato + OG	0.015	99	Aumentó 2 veces

CONDICIONES SULFATO-REDUCTORAS			
Etanol/lactato/sulfato	0.037	82	
Etanol/lactato/sulfato + OG	0.135	98	Aumentó 3.6 veces

El valor de *k* se calculó asumiendo una reacción de primer orden.
OG= óxido de grafeno.

Si bien es cierto, comparando con otros trabajos, como se muestra en la Tabla 11, en el presente estudio se obtuvieron menores constantes de velocidades de reducción, lo anterior pudo haberse debido a factores como la modificación del material, bajas concentraciones del colorante o el estado hidrolizado del mismo, que en conjunto pudieron influir en el aumento de la velocidad de reducción [van der Zee, 2005; dos Santos, 2006]. Sin embargo, es destacable el uso, en el presente trabajo, de una mayor concentración de colorante en un estado no hidrolizado, con altas eficiencias de remoción, comparados con otros MR a base de carbono (Tabla 11).

Tabla 11. Reducción del colorante RR2 en presencia de diferentes mediadores redox, en un sistema metanogénico.

Concentración del colorante	Tipo de proceso	Mediador redox	Donador de electrones	Eficiencia de reducción (%)	k (h⁻¹)	Referencia
HRR2 (0.073mM)	RB continuo UASB	CA (Norit SA-4) 2.5g	AGV	35	-	Van der Zee et al. (2003).

***Continuación (Tabla 11)**

HRR2 (0.25mM)	RB en lote	CA modificado con H ₂ . (0.6g/L)	AGV	90	0.81 ± 0.062	Pereira et al. (2010).
RR2 (0.5mM)	RB en lote	OG (5mg/L)	Lactato/ etanol	99	0.01 ± 0.00041	Presente estudio

RR2=rojo reactivo, HRR2=rojo reactivo 2 hidrolizado, CA=carbón activado, AQDS=antraquinona 2,6-disulfonato, OG=óxido de grafeno, AGV=ácidos grasos volátiles, RB=reducción biológica.

6.4.2.- REDUCCIÓN DEL 3-CLORONITROBENCENO

6.4.2.1.- REDUCCIÓN QUÍMICA

Los resultados de la cinética de reducción química se muestran en la Figura 26. En controles incubados sólo con OG (OG + 3CNB), para observar el efecto de adsorción y/o reducción por parte del OG hacia el 3CNB, no se observó una reducción del contaminante ni se detectó en el medio la presencia del subproducto de degradación del 3CNB (3CA). En contraste, el agente reductor (3CNB+Na₂S) sin MR, incidió sobre la reducción del contaminante, en un 20% de reducción, detectando 0.2 mM de 3CA en el medio. Finalmente, en el tratamiento completo (OG + Na₂S + 3CNB), claramente se observa un efecto sobre el contaminante lográndose alrededor de un 80% de reducción al cabo de 115 h, detectándose hasta 0.5 mM de 3CA.

Hasta el momento, se ha comprobado la efectiva funcionalidad como MR del OG para reducir el 3CNB en un ambiente químico, aumentando la k_{3CNB} 7.5 veces respecto al experimento sólo con el agente reductor (sulfuro). De igual forma, comparando mmol de contaminante reducido por gramo de material con otros trabajos que utilizaron materiales a base de carbono como MR en un ambiente químico (Tabla 12), el presente trabajo se coloca con mejor rendimiento (0.08 mmol de 3CNB reducido/mg de OG) por sobre los trabajos como el de Amezcua-García et al. (2013), con 0.0038 mmol de 3CNB reducido/mg de fibras de carbón oxidadas, y Fu et al. (2013), con 0.0128 mmol de nitrobenzeno reducido/mg de

OG. Lo anterior se pudo deber a que el OG posee una vasta diversidad de grupos funcionales en su superficie y una disponibilidad total de los mismos para interactuar con el contaminante.

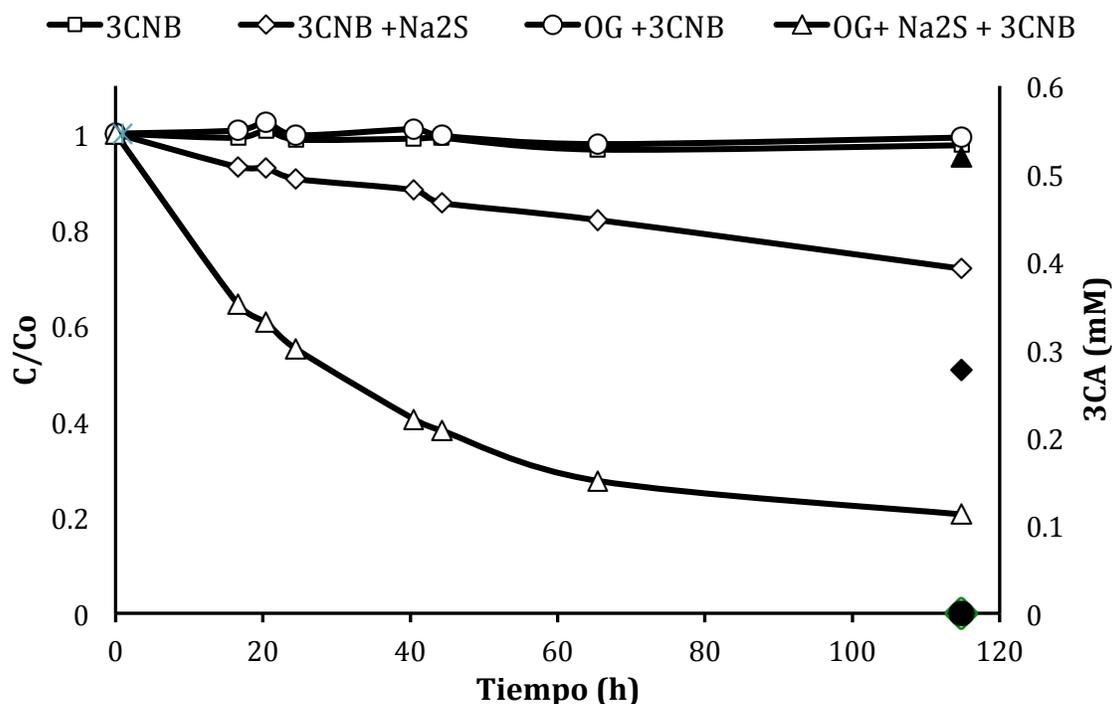


Figura 26. Cinética de reducción química del 3CNB. Símbolos negros, representan la concentración de 3CA al final de la cinética. T= 25°C.

Tabla 12. Reducción química de diferentes compuestos nitroaromáticos en presencia de un MR a base de carbono.

Compuesto	Mediador redox	k(h ⁻¹)	Eficiencia de reducción (%)	Referencia
3CNB (0.5mM)	FCA (0.00526g/ 50ml)	-	80	Amezquita-García et al. (2013).
NB (80µM)	OG (5mg/L)	0.0077 ± 0.0034	80	Fu et al. (2013).
3CNB (0.5mM)	OG (5mg/ L)	0.02 ± 0.003	80	Presente estudio

k=constante de primer orden, FCA=fibras de carbón activado, NB=nitrobenzeno, 3CNB= 3-cloronitrobenzeno, OG=óxido de grafeno.

6.4.2.2.- REDUCCIÓN BIOLÓGICA

Los resultados de la cinética de reducción biológica con lodo metanogénico se muestran en la Figura 27A. Para el experimento control (biomasa estéril+ OG), no se detectó alguna reducción del 3CNB en el medio, ni el subproducto de degradación. Por el contrario, para el control con biomasa estéril sin OG (biomasa estéril), se detectó un 5% de reducción de concentración del contaminante en el medio al cabo de 40h, lo anterior se puede deber a un fenómeno de sorción sobre la biomasa ya que no se detectó en el medio su subproducto de degradación. Finalmente para los experimentos con biomasa metanogénica con y sin OG (Biomasa + 3CNB+ OG y Biomasa + 3CNB), la diferencia de reducción es mínima entre ambos experimentos, se observó una reducción alrededor de un 60% al cabo de 40 h, comprobándose al detectar la 3CA en el medio, hasta 0.6mM.

Por otro lado, los resultados de la cinética de reducción biológica con lodo sulfato reductor se muestran en la Figura 27B. En ambos experimentos control (biomasa estéril + OG y Biomasa estéril), no se detectó alguna reducción del 3CNB, ni se detectó el subproducto de degradación en el medio. Finalmente para los experimentos con biomasa sulfato reductora con y sin OG (Biomasa + 3CNB+ OG y Biomasa + 3CNB), al cabo de 13 h se observa una reducción de concentración en el medio de un 50%, detectándose hasta 0.6mM de 3CA en el medio.

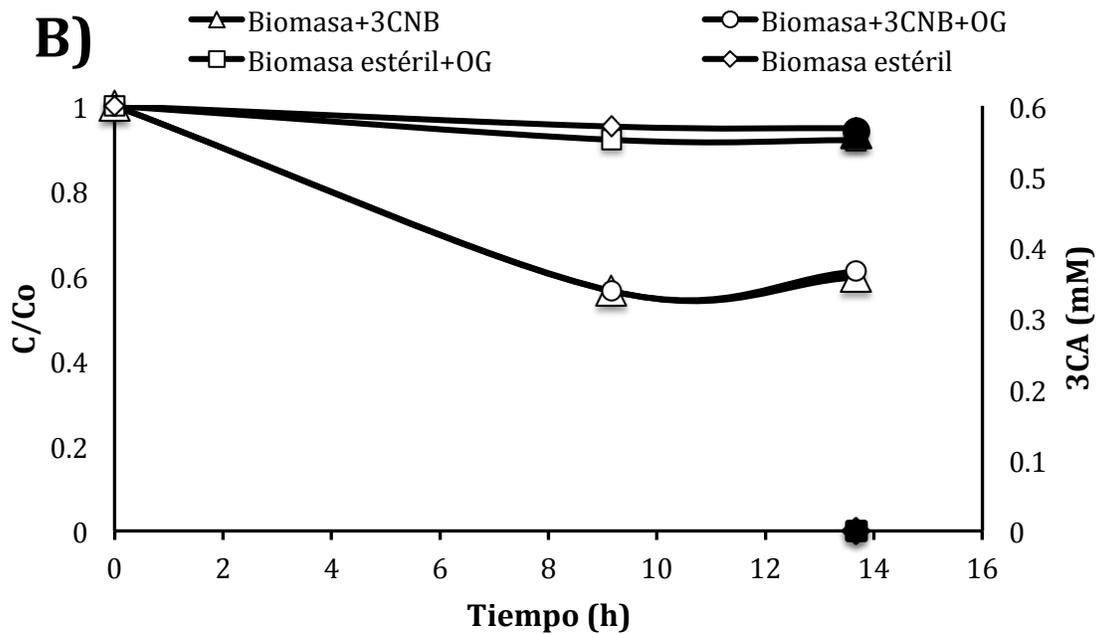
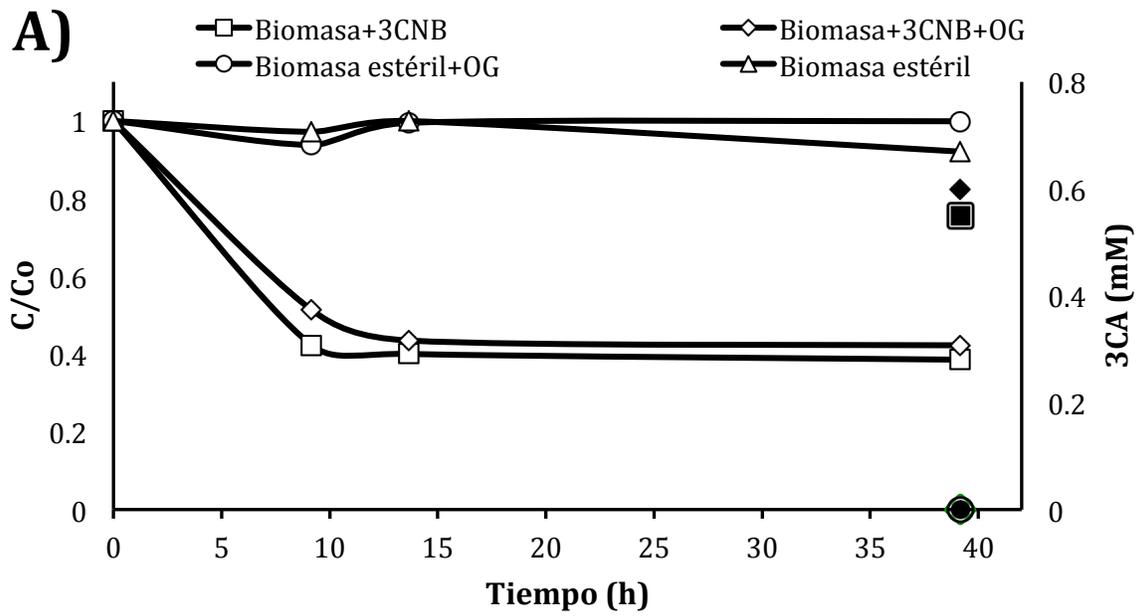


Figura 27. Cinética de reducción biológica para el 3CNB. $T = 25^{\circ}\text{C}$. A) Biomasa metanogénica. B) Biomasa sulfato reductora. Símbolos negros representan la concentración de 3CA al final de la cinética.

Las bajas eficiencias de reducción en un ambiente biológico se pudieron haber debido a un efecto tóxico sobre las diversas comunidades microbianas presentes en el sistema anaerobio. Valores de IC50 (concentración del contaminante causando una inhibición del 50%) para diferentes compuestos nitroaromáticos en sistemas metanogénicos, oscilan entre 0.014 a 0.12 mM [Johnson et al., 1983; Donlon et al, 1995;. Bhattacharya et al, 1996]. Tomando en cuenta lo antes mencionado y que en el presente trabajo se utilizó una concentración 4 veces mayor al límite superior de IC50, un efecto tóxico sobre ambas comunidades fue inevitable, reflejado en las bajas tasas de reducción y en la nula actividad metanogénica a lo largo de toda la cinética, para el lodo metanogénico y sulfato-reductor (Figura 28); y de igual forma, una inhibición de comunidades sulfato reductoras, reflejado en un nulo consumo de sulfato (Figura 28B) a lo largo de toda la cinética. La toxicidad de estos compuestos hacia las comunidades metanogénicas puede implicar interacciones entre el compuesto nitroaromático o intermedios del proceso de reducción (nitrosaminas o hidroxilaminas) y componentes de la membrana celular de los metanógenos. También pueden interferir con reacciones bioquímicas, tales como el desacoplamiento de las reacciones de fosforilación o interfiriendo con pares redox fisiológicos [Donlon et al., 1995]. Por lo anterior, las comunidades microbianas no pudieron intervenir sobre la reducción del contaminante debido al efecto tóxico sobre ellas.

Otro factor importante que se ha reportado previamente en cultivos metanogénicos, es un efecto de lisis celular generado por el contaminante, debido a que la acumulación de contaminantes no polares en la membrana bacteriana provoca que esta se hinche y debilite, lo que altera gradientes iónicos y eventualmente causa lisis celular [Gorontzy et al., 1993; Donlon et al, 1995; Razo-Flores et al. 1997]. A causa de ello, componentes celulares como proteínas, transportadores de electrones, coenzimas, entre muchos otros más, quedaron expuestos para interactuar con el contaminante y tomar el papel principal en la reducción del 3CNB. Previamente ya se ha reportado la capacidad de lisados celulares metanogénicos de reducir diferentes compuestos nitroaromáticos,

inclusive obteniendo mejores eficiencias de reducción sobre experimentos control (biomasa activa) [Gorontzy et al., 1993; Donlon et al, 1995].

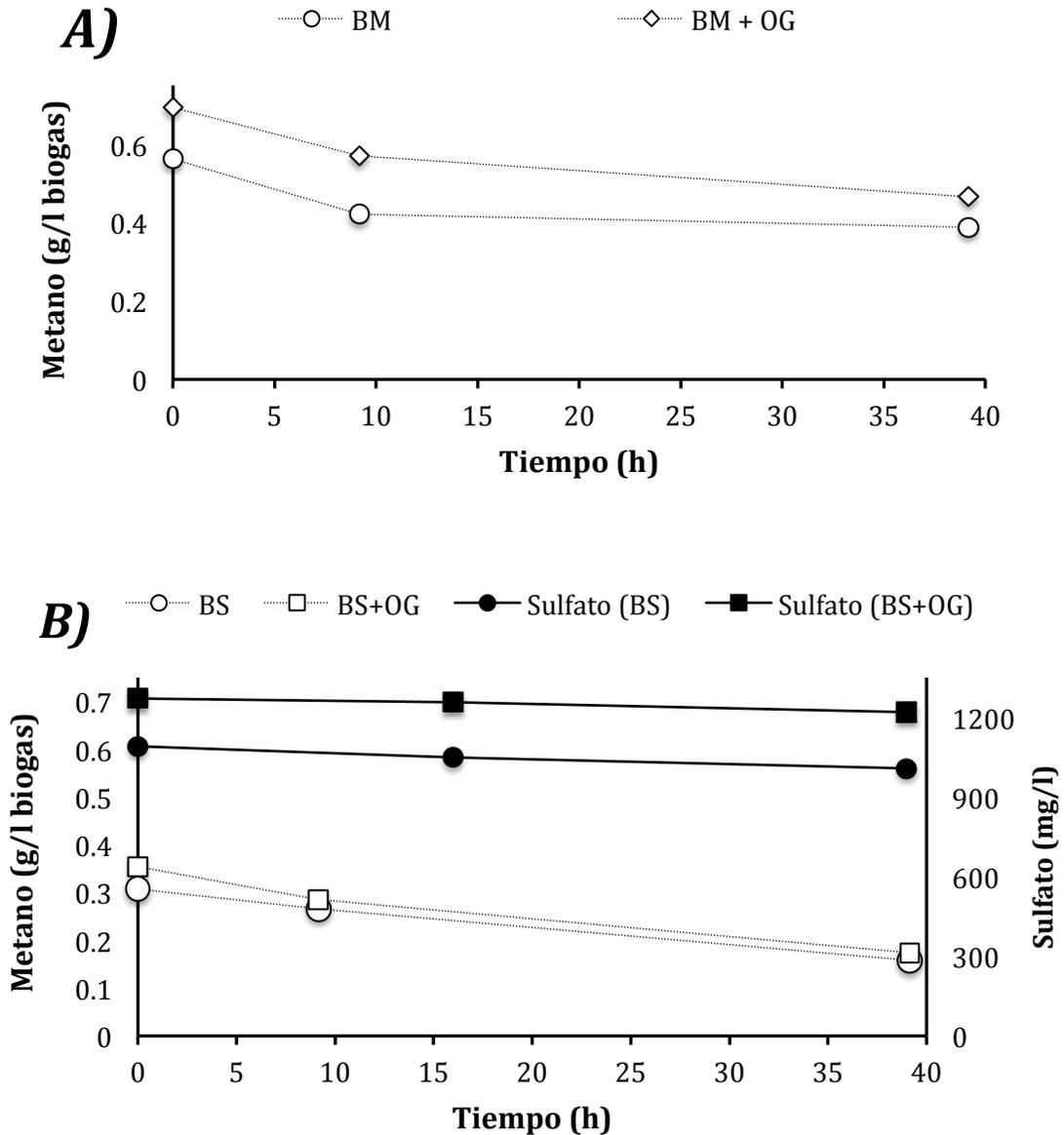


Figura 28. Perfil de producción de metano (Símbolos blancos) y consumo de sulfato (Símbolos negros). A) Lodo metanogénico. B) Lodo sulfato-reductor.

Por otra parte, el OG en un ambiente biológico no actuó como MR bajo ambas condiciones, metanogénicas y sulfato-reductoras. Primeramente hay que recalcar que el sistema contaba con un adecuado ORP para que la transferencia de

electrones no fuera un factor que limitara la actividad como MR del OG (Figura 18). De igual forma, se comprobó su capacidad como MR en un ambiente químico frente al 3CNB (Figura 26). Por lo anterior, la falta de funcionalidad como MR del OG en un ambiente biológico en presencia del 3CNB, se atribuye a un efecto de “envoltura” de los componentes celulares presentes en el medio hacia el OG, debido a la lisis celular generada por el 3CNB, los cuales inhibieron la transferencia de electrones hacia el contaminante y por lo tanto su funcionalidad como MR. Lo anterior se esquematiza en la Figura 29.

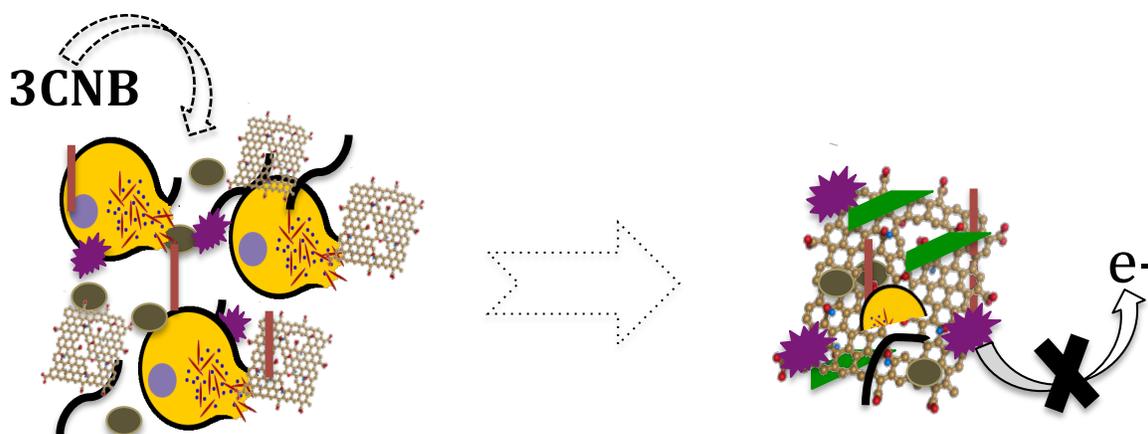


Figura 29. Inhibición de la transferencia de electrones por los componentes celulares, debido al efecto “envoltura”, sobre el OG.

Las interacciones que se pudieron llevar a cabo entre componentes celulares y las láminas de OG, fueron desde atracciones electrostáticas hasta interacciones químicas entre grupos funcionales presentes en el OG y los componentes celulares [Wang et al., 2011].

7.- CONCLUSIONES

- El OG frente al RR2 actuó como un efectivo MR en todos los tratamientos, aumentando la constante de velocidad inclusive hasta en un orden de magnitud en el tratamiento químico (sulfuro+OG). Adicionalmente, presentando un ORP apropiado para promover la reducción de este colorante.
- El tratamiento ideal para la reducción del RR2, es un proceso sulfato reductor. Obteniendo altas eficiencias de remoción en un menor tiempo (24h). Lo anterior atribuido a la alta concentración de sulfuro presente en el medio.
- El OG actuó claramente como un MR aumentando la velocidad de reducción del 3-CNB bajo condiciones abióticas. Sin embargo, bajo condiciones metanogénicas y sulfato-reductoras, el OG no actuó como MR. Lo anterior se pudo deber a un efecto de “envoltura” de los componentes celulares presentes en el medio, debido a la lisis celular generada por el contaminante, los cuales inhibieron la transferencia de electrones hacia el material y por lo tanto hacia el contaminante.
- Las láminas de grafeno, tienden a flocular a mayor concentración de las mismas en el medio. Lo anterior debido a las interacciones de van der Waals y los orbitales π de los átomos de carbono entre los parches hidrofóbicos del material.
- A mayor concentración de OG en el medio, las eficiencias de reducción disminuyen; lo anterior debido a una pérdida de área superficial y por lo tanto de grupos funcionales expuestos para su interacción directa con el agente reductor y su posterior acción sobre el contaminante.

8.- PERSPECTIVAS

- Continuar con la caracterización del material post cinética de reducción, con la finalidad de observar los cambios morfológicos y químicos en su estructura y así poder dilucidar de manera más acertada la funcionalidad y el mecanismo del OG como mediador redox.
- Estudiar las interacciones microorganismos-OG-contaminantes, las cuales pudieron estar involucradas en la fallida actividad como MR en presencia del contaminante 3CNB bajo condiciones metanogénicas y sulfato-reductoras.
- Realizar cinéticas de reducción en condiciones que se presentan en efluentes industriales.
- Modificar el material con la finalidad de aumentar su capacidad como MR.

9.- REFERENCIAS

- Agnoli S, Gaetano Granozzi G (2013) Second generation graphene: Opportunities and challenges for surface science. *Surface Science* 609:1–5.
- Ahmed F, Rodrigues DF (2013) Investigation of acute effects of graphene oxide on wastewater microbial community: A case study. *Journal of Hazardous Materials* 256–257:33–39.
- Amezquita-Garcia HJ, Razo-Flores E, Cervantes FJ, Rangel-Mendez JR (2013) Activated carbon fibers as redox mediator for the increased reduction of nitroaromatics. *Carbon* 55:276-284.
- Arora PK, Ch. Sasikala Ch, Ramana V (2012) Degradation of chlorinated nitroaromatic compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:2265–2277.
- Bandosz T (2006) *Activated Carbon Surfaces in Environmental Remediation*, Elsevier, 7: 5-11,161-163.
- Bansal R.C, Goyal M. (2005) *Activated carbon adsorption*. Taylor & Francis. Florida, 1-84.
- Beydilli M, Pavlostathis S, Tincher W (2000) Decolorization of the Azo Dye Reactive Red 2 Under Various Oxidation Reduction Conditions. *Water Environment Research*, 72:698-675.
- Bhattachary S, Q M, Madura RL (1996) Effects of nitrobenzene and zinc on acetate utilizing methanogens. *Water Res.* 30:3099– 3105.
- Bianco A (2013) Graphene: Safe or Toxic? The Two Faces of the Medal. *Angew. Chem. Int.* 52:4986-4997-
- Bianco A, Cheng HM, Enoki T, Gogotsi Y, Hurt RH, Koratkar N, Kyotani T, Monthieux M, Park CR, Tascon JMD, Zhang J (2013) All in the graphene family – A recommended nomenclature for two-dimensional carbon materials, *Carbon*, 65:1-6.
- Boehm HP (1994) Some aspects of the surface chemistry of carbon blacks and other carbons. *Carbon* 32:759-769.
- Cervantes FJ (2008) Reducción de colorantes azo por distintos grupos microbianos en consorcios anaerobios. *BioTecnología*, 12:3.
- Cervantes FJ, Enríquez JE, Galindo-Petatán E, Arvayo H, Razo-Flores E, Field JA (2007) Biogenic sulphide plays a major role on the riboflavin

mediated decolourisation of azo dyes under sulphate reducing conditions. *Chemosphere*, 68: 1082-1089.

- Cervantes FJ, Van der Zee FP, Lettinga G, Field JA, (2001) Enhanced decolourisation of acid orange 7 in a continuous UASB reactor with quinones as redox mediators. *Water Sci Technol.* 4:123-128, 2001.
- Chen Y, Cheng JJ, Creamer KS (2008) Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology* 99:4044–4064.
- Cooney DO (1999) Adsorption Design for Wastewater Treatment. Lewis Publishers. 34-35.
- Cord-Ruwisch (1985) A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *J. Microbiol. Meth.* 4:33- 36.
- Diniz PE, Lopes AT, Lino AR, Serralheiro ML (2002) Anaerobic reduction of a sulfonated azo dye Congo Red by sulphate reducing bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 97:147–163.
- Donlon BA, Razo-Flores E, Field JA, Lettinga G (1995) Toxicity of N-substituted aromatics to acetoclastic methanogenic activity in granular sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3889–3893.
- dos Santos AB (2005) Reductive decolourisation of dyes by thermophilic anaerobic granular sludge. PhD Thesis. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- dos Santos AB, Bisschops IAE & Cervantes FJ (2006) Closing process water cycles and product recovery in textile industry: perspective for biological treatment. In: *Advanced Biological Treatment Processes for Industrial Wastewaters: Principles & Applications*. Cervantes FJ, Pavlostathis SG & van Haandel A (eds). IWA Publishing. pp. 298-320.
- dos Santos AB, Cervantes FJ, Van Lier JB (2004) Azo dye reduction by thermophilic anaerobic granular sludge, and the impact of the redox mediator AQDS on the reductive biochemical transformation. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:62–69.
- dos Santos AB, Cervantes FJ & van Lier JB (2007) Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. *Biores. Technol.* 98: 2369-2385.

- Dunnivant FM, Schwarrenbach RP (1992) Reduction of Substituted Nitrobenzenes in Aqueous Solutions Containing Natural Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.*, 26:1992-2133.
- Espinoza B (2007) Evaluación del desarrollo de la actividad sulfatorreductora en un lodo granular metanogénico de diferentes tamaños. Tesis de Maestría. Ciencias Ambientales, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.
- Field JA, Brady J (2003) Riboflavin as a redox mediator accelerating the reduction of the azo dye Mordant Yellow 10 by anaerobic granular sludge. *Water Science & Technology* 48:187-193.
- Field, JA, Cervantes F. J., van der Zee F.P, Lettinga G. (2000) Role of quinones in the biodegradation of priority pollutants: a review. *Water Sci Technol.* 42 5-6:215-222.
- Field JA, Stams AJM, Kato M & Schraa G (1995) Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. *Antonie van Leeuwenhoek*, 67:47-77.
- Fu Heyun, Zhu Dongqiang (2013) Graphene Oxide-Facilitated Reduction of Nitrobenzene in sulfide-containing aqueous solutions. *Environ Sci Technol* 47:4204-4210.
- García A (2008) Inmovilización de mediadores redox en matrices poliméricas y su aplicación en la biotransformación reductiva de un colorante azo. Tesis de Maestría. Ciencias Ambientales, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.
- Gong W, Liu X, Xue W, Fu W, Cheng D (2014) Reduction of nitrobenzene with sulfides catalyzed by the black carbons from crop-residue ashes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 6162-6169.
- Gorontzy T, Küver J, Blotegovel KH (1993) Microbial transformation of nitroaromatic compounds under anaerobic conditions. *Journal of General Microbiology* 139:1331-1336.
- Heyun F, Dongqiang Z (2013) Graphene Oxide-Facilitated Reduction of Nitrobenzene in sulfide-containing aqueous solutions *Environ Sci Technol*, 47:4204-4210.
- Johnson LD, Young JC (1983) Inhibition of anaerobic digestion by organic priority pollutants. *J. Water Pollut. Control Fed.* 55:1441-1449.

- Ju KS, Parales RE (2010) Nitroaromatic compounds, from synthesis to biodegradation. *Microbiology and molecular biology reviews* 74:250-272.
- Lesiaka B, Stobinska L, Malolepszyb A, Mazurkiewicz M, Kövér L, Tóth J (2014) Preparation of graphene oxide and characterisation using electron spectroscopy. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* 193:92–99
- Li Z, Young RJ, Wang R, Yang F, Hao L a, Jiao W, Liu W (2013) The role of functional groups on graphene oxide in epoxy nanocomposites. *Polymer* 54:5821-5829.
- Li L, Wang J, Zhou J, Yang F, Jin C, Qu Y, Li A, Zhang L (2008) Enhancement of nitroaromatic compounds anaerobic biotransformation using a novel immobilized redox mediator prepared by electropolymerization. *Bioresource Technology* 99:6908–6916.
- Liu S, Zeng TH, Hofmann M, Burcombe E, Wei J, Jiang R, Kong J, Chen Y (2013) Antibacterial Activity of Graphite, Graphite Oxide, Graphene Oxide, and Reduced Graphene Oxide: Membrane and Oxidative Stress. *American Chemical Society*, 5:6971-6980.
- Liu S, Hu M, Zeng TH, Wu R, Jiang R, Jun Wei J, Wang L, Kong J, Chen Y (2012) Lateral Dimension-Dependent Antibacterial Activity of Graphene Oxide Sheets. *American Chemical Society*, 28:12364-12372.
- Martínez CM, Celis LB, Cervantes FJ (2013) Immobilized humic substances as redox mediator for the simultaneous removal of phenol and reactive red 2 in a UASB reactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:9897-9905.
- Mezohegyu G, Goncalves F, Órfão J, Fabregat A, Fortuny A, Font J, Bengoa C, Stuber F (2010) Tailored activated carbons as catalyst in biodegradation of textile azo dyes. *Appl. Catal B., Environ.* 94, 179-185.
- Ozdemir S, Cirik K, Akman D, Sahinkaya E, Cinar O (2013) Treatment of azo dye-containing synthetic textile dye effluent using sulfidogenic anaerobic baffled reactor. *Bioresource Technology* 146:135–143.
- Padda RS, Wang C, Hughes JB, Kutty R, Bennet GN (2003) Mutagenicity of nitroaromatic degradation compounds. *Environ Toxicol Chem* 22:2293-2297.
- Pei S, Cheng HM (2012) The reduction of graphene oxide. *Carbon*, 50:3210–3228.

- Pereira RA, Pereira MFR, Alves MM, L. Pereira L (2014) Carbon based materials as novel redox mediators for dye wastewater biodegradation. *Applied Catalysis B: Environmental* 144:713–720.
- Pereira L, Pereira R., Pereira MFR, van der Zee FP, Cervantes FJ, Alves MM (2010) Thermal modification of activated carbon surface chemistry improves its capacity as redox mediator for azo dye reduction. *Journal of Hazardous Materials* 183:931–939.
- Prato-Garcia D, Cervantes FJ, Buitron (2013) Azo dye decolorization assisted by chemical and biogenic sulfide. *Journal of Hazardous Materials* 250–251:462–468.
- Purohit V, Basu AK (2000) Mutagenicity of nitroaromatic compounds. *Chem Res Toxicol* 13:673-692.
- Qiu H, Lv Lu, Pan BC, Zhang QJ, Zhang WI, Zhang QI (2009) Critical review in adsorption kinetic models. *J Zhejiang Univ Sci A*,10:716-724.
- Qiuju D, Jiankun S, Yanhui L, Xiaoxia Y, Xiaohui W, Zonghua W, Linhua X (2014) Highly enhanced adsorption of congo red onto graphene oxide/chitosan fibers by wet-chemical etching off silica nanoparticles. *Chemical Engineering Journal*, 245:99–106.
- Rau J, Maris B, Kinget R, Samyn C, van den Mooter G, Stolz A (2002) Enhanced anaerobic degradation of polymeric azo compounds by *Escherichia coli* in the presence of low- molecular-weight redox mediators. *J. Pharm. Pharmacol.* 54: 1471-1479.
- Razo-Flores E (1997) Biotransformation and Biodegradation of N-Substituted Aromatics in Methanogenic Granular Sludge. PhD Thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- Ruiz ON, Fernando KAS, Wang B, Brown NA, Luo PG, McNamara ND, Vangsness M, Sun YP, Bunker CE (2011) Graphene Oxide: A Nonspecific Enhancer of Cellular Growth. *American Chemical Society* 5:8100-8107.
- Schwarzenbach RP, Stlerl R, Lanz K, Zeyer J (1990) Quinone and Iron Porphyrin Mediated Reduction of Nitroaromatic Compounds in Homogeneous Aqueous Solution. *Environ. Sci. Technol*, 24:1566-1574.
- Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ (2005) Spectrometric identification of organic compounds. Wiley, 7:72–126.

- Terrones H, Lv R, Terrones M, Dresselhaus MS (2012) The role of defects and doping in 2D graphene sheets and 1D nanoribbons. *Rep. Prog. Phys.* 75:30.
- van der Zee FP (2002) Anaerobic azo dye reduction. PhD Thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- van der Zee FP, Bisschops IAE, Blanchard VG, Bouwman RHM, Lettinga G, Field JA (2003) The contribution of biotic and abiotic processes during azo dye reduction in anaerobic sludge. *Water Res.* 37: 3098-3109.
- van der Zee FP, Cervantes FJ (2009) Impact and application of electron shuttles on the redox (bio)transformation of contaminants: A review. *Biotechnology Advances* 27:256–277.
- Wang Y, Li Z, Wang J, Li J, Lin Y (2011) Graphene and graphene oxide: biofunctionalization and applications in biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 5:205-2012.
- Wang J, Wang Di, Lui G, Jin R, Lu H (2013) Enhanced nitrobenzene biotransformation by graphene-anaerobic sludge composite. *Chem Technol and biotech* doi: 10.1002/jctb.4182.
- Yoo ES, Libra J, Wiesmann U (2000). Reduction of azo dyes by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Water Science and Technology* 41:15–22.)