



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

POSGRADO EN CIENCIAS APLICADAS

**Aspectos cinéticos en la bio-transformación
reductiva de tetracloruro de carbono en presencia
de sustancias húmicas suspendidas e inmovilizadas**

Tesis que presenta
Arturo Márquez Pavón

Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Aplicadas

En la opción de
Ciencias Ambientales

Codirectores de la Tesis:
Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo
Dra. Sonia Lorena Arriaga García

San Luis Potosí, S.L.P., Septiembre de 2009



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Aspectos cinéticos en la bio-transformación reductiva de tetracloruro de carbono en presencia de sustancias húmicas suspendidas e inmovilizadas**” presentada para obtener el Grado de de Maestro en Ciencias Aplicadas en la opción de Ciencias Ambientales fue elaborada por **Arturo Márquez Pavón** y aprobada el **18 de septiembre de 2009** 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)

Dra. Sonia Lorena Arriaga García
(Director de la tesis)

Dr. Germán Buitrón Méndez
(Asesor de la tesis)

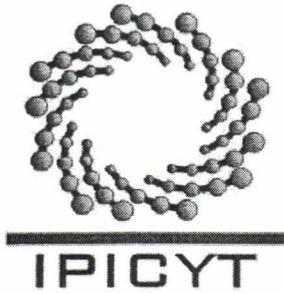


Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en los laboratorios de Ingeniería y Biotecnología Ambiental, Análisis Instrumental, y Ecología y Cambio Global de la División de Ingeniería Ambiental y Manejo de Recursos Naturales Renovables; y del Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de los Doctores Francisco Javier Cervantes Carrillo y Sonia Lorena Arriaga García.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-211823) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Este trabajo fue financiado por los proyectos SEP-CONACYT–55045 y Lettinga Award 2007, otorgado por la fundación Letinga y financiado por las empresas Bioethane Systems Int., Paques Natural Solution y Royal Haskoning.



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 027 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Aplicadas en la opción de Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 18 días del mes de septiembre del año 2009, 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. Germán Buitrón Méndez	Presidente	UNAM
Dra. Sonia Lorena Arriaga García	Secretaria	IPICYT
Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo	Sinodal	IPICYT

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

**MAESTRO EN CIENCIAS APLICADAS
EN LA OPCIÓN DE CIENCIAS AMBIENTALES**

sustentó el C.

Arturo Márquez Pavón

sobre la Tesis intitulada:

Aspectos cinéticos en la bio-transformación reductiva de tetracloruro de carbono en presencia de sustancias húmicas suspendidas e inmovilizadas

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Sonia Lorena Arriaga García
Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 17:35 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 18 días del mes de septiembre de 2009.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Dr. Marcial Bonilla Méndez
Secretario Académico



Dedicatoria

A mis padres.

Agradecimientos

A la Dra. Sonia Arriaga García, por las valiosas enseñanzas y dirección que me brindó durante la elaboración de la tesis.

Al Dr. Francisco Cervantes Carrillo, por haberme permitido incorporarme a su excelente grupo de trabajo y por la dirección del presente trabajo.

A la Dra. Silvia Ceballos Magaña, por su indispensable ayuda durante el análisis de muestras en el laboratorio.

A todos mis compañeros de maestría, quienes contribuyeron a la realización de ésta tesis y al curso de la maestría.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Resumen	ix
Abstract	xi
1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1. Sustancias húmicas	3
2.2. Interacciones entre microorganismos y sustancias húmicas	5
2.2.1. Sustancias húmicas como aceptores de electrones	6
2.2.2. Sustancias húmicas como mediador redox en bio-transformaciones reductivas	7
2.2.3. Sustancias húmicas como donadores de electrones	12
2.3. Reducción biológica de sustancias húmicas	13
2.4. Inmovilización de sustancias húmicas	19
2.5. Etapas en los procesos de bio-transformación reductiva en presencia de mediadores redox	22
2.6. Contaminantes orgánicos halogenados	23
2.6.1. Tetracloruro de carbono	25
3. Justificación	27
3.1. Objetivos	28
3.2. Hipótesis	28
4. Materiales y Equipo	29
4.1. Materiales	29
4.2. Equipo	29
5. Metodología	31
5.1. Caracterización de los consorcios	31
5.2. Sulfonación de sustancias húmicas	32
5.3. Inmovilización de sustancias húmicas	32
5.4. Cinéticas de reducción biológica de sustancias húmicas	34
5.4.1. Curvas de calibración	36
5.5. Reducción química de las sustancias húmicas	38
5.6. Cinética de reducción química de tetracloruro de carbono	39
5.7. Cinética de reducción biológica de tetracloruro de carbono en presencia de sustancias húmicas	40
5.8. Adsorción de tetracloruro de carbono en resinas de intercambio iónico	41
6. Resultados	44
6.1. Inmovilización de las sustancias húmicas	44
6.2. Cinéticas de reducción biológica de sustancias húmicas	44

6.2.1. Cinéticas de reducción biológica de sustancias húmicas suspendidas	44
6.2.2. Cinéticas de reducción biológica de sustancias húmicas inmovilizadas	50
6.3. Reducción química de las sustancias húmicas	55
6.4. Reducción química de tetracloruro de carbono en presencia de sustancias húmicas	55
6.5. Reducción biológica de tetracloruro de carbono en presencia de sustancias húmicas	59
7. Discusión	64
7.1. Cinéticas de reducción biológica de sustancias húmicas, primera etapa	65
7.1.1. Consumo de sustrato durante la cinética de reducción biológica de sustancias húmicas	66
7.2. Reducción química de tetracloruro de carbono en presencia de sustancias húmicas, segunda etapa	70
8. Conclusión y perspectivas	80
9. Referencias	82

Resumen

Aspecto cinéticos en la bio-transformación reductiva de tetracloruro de carbono en presencia de sustancias húmicas suspendidas e inmovilizadas.

PALABRAS CLAVE. Mediadores redox, deshalogenación, solventes, inmovilización.

En la presente investigación se evaluaron los aspectos cinéticos en la bio-transformación reductiva de tetracloruro de carbono (TCC), en presencia de sustancias húmicas (SH) suspendidas e inmovilizadas. Para ello, se estudiaron las dos etapas involucradas en el proceso de óxido-reducción en el que las SH actúan como mediador redox. La primera etapa comprende la reducción biológica de las SH a partir del consumo de un sustrato orgánico (donador de electrones). Al respecto, se determinó la tasa máxima de reducción de SH de dos consorcios anaerobios (PR y U), mediante cinéticas en cultivo en lote. Una de las cinéticas correspondió a SH suspendidas (Leonardita, utilizada tal cual fue adquirida), y otra que correspondió a SH inmovilizadas, mediante un proceso previo de sulfonación y posterior inmovilización sobre una resina de intercambio iónico. Durante las cinéticas, se midió el consumo de sustrato, así como la aparición de ácidos grasos volátiles (AGVs) e hidrógeno, productos del consumo de glucosa, y posterior desaparición de ellos. Los resultados indicaron que el acetato e hidrógeno, producidos a partir de la fermentación de glucosa, fueron utilizados por ambos consorcios evaluados como los donadores de electrones primarios para llevar a cabo la reducción de las SH. La tasa máxima de reducción de SH por PR y U fue de 247 y 167 $\mu\text{Eq/g SSV-h}$, respectivamente, para el caso de las SH suspendidas. En el caso de las SH inmovilizadas, las tasas máximas de reducción fueron de 95 y 55 $\mu\text{Eq/g SSV-h}$ para PR y U, respectivamente.

Posteriormente, se evaluó la segunda etapa del proceso, la cual involucró la reducción de TCC a partir de las SH reducidas. La primera parte en esta etapa consistió en reducir las SH químicamente usando hidrógeno, en presencia de paladio como catalizador. Una vez reducidas las SH, se determinó su capacidad para reducir TCC. Las SH suspendidas presentaron una mejor tasa de reducción de primer orden de TCC ($8.6 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$), en comparación con las SH inmovilizadas ($5.8 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$). Además, el TCC fue adsorbido sobre la resina de intercambio iónico, utilizada como soporte para las SH. Dicha adsorción, hasta las 24 horas de incubación, fue del 40% de la concentración inicial de TCC (100 μM). Por otro lado, el perfil de reducción química de TCC, en presencia de SH suspendidas, presentó dos pendientes, lo cual fue atribuido a la formación de radicales semi-quinona, los cuales dieron pie a un cambio en la tasa de reducción de TCC. Además, se documentó la aparición de cloroformo (CF) como único producto de la reducción química de TCC.

A partir de las tasas de bio-reducción de SH y de las tasas de reducción química de TCC, fue posible determinar las tasas de transferencia de electrones en cada una de las etapas del proceso de bio-transformación reductiva de TCC. Las cuales, en presencia de SH suspendidas, fueron de 24.7 y 1.7×10^{-2} $\mu\text{Eq/L-h}$ en la primera y segunda etapa del proceso, respectivamente. Mientras que, en presencia de SH inmovilizadas, fueron de 9.5 y 1.2×10^{-2} $\mu\text{Eq/L-h}$ en la primera y segunda etapa del proceso, respectivamente.

De lo anterior se concluyó que el proceso de bio-transformación reductiva de TCC, está limitado por la transferencia de electrones desde las SH reducidas hacia el TCC. Otro aspecto considerado en este estudio, consistió en evaluar la capacidad de un consorcio reductor del humus para reducir el TCC en presencia de SH suspendidas e inmovilizadas. Para estos experimentos se utilizó el consorcio PR, debido a que éste presentó la mayor tasa de reducción de SH en la primera etapa del estudio. En este caso, la tasa de bio-reducción de TCC fue 13.6 veces mayor en presencia de SH inmovilizadas ($1.5 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$) que en presencia de SH suspendidas ($1.1 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$), y 2.6 veces mayor que en presencia de SH inmovilizadas, reducidas químicamente ($5.8 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$). La menor tasa de bio-reducción de TCC en presencia de SH suspendidas, se debió a la inhibición de la actividad del consorcio PR, producto de la toxicidad que la concentración inicial de TCC ($100 \mu\text{M}$) causó sobre el consorcio. Mientras que, la mayor tasa de reducción de TCC en presencia de SH inmovilizadas, fue atribuida a la adsorción del TCC sobre la resina de intercambio iónico, lo que permitió atenuar la toxicidad del TCC sobre el consorcio. Además, la adsorción de TCC sobre la resina de intercambio iónico, quizá contribuyó a mejorar el transporte de electrones entre las SH reducidas y el solvente. Por otro lado, se detectó CF como producto principal de reducción de TCC en las incubaciones con el consorcio PR, en presencia de SH suspendidas e inmovilizadas.

El presente estudio demuestra la factibilidad de utilizar SH inmovilizadas para lograr la bio-transformación reductiva de contaminantes con grupos electrofílicos, como solventes polihalogenados. Esta información es relevante para optimizar su aplicación en sistemas de tratamiento de aguas residuales.

Abstract

Kinetics aspects in the reductive bio-transformation of carbon tetrachloride in the presence of suspended and immobilized humic substances.

KEYWORDS. Redox mediators, dehalogenation, solvents, immobilization.

In the present study, the kinetic aspects involved in the reductive bio-transformation of carbon tetrachloride (CT), in the presence of suspended humic substances (HS) and immobilized HS, were evaluated. In consequence, the two stages involved in the redox reactions in which HS take part, were studied. The first stage comprises the bio-reduction of HS, linked to the anaerobic oxidation of glucose (electron donor), by two different anaerobic consortia (PR and U). The maximum reduction rate of suspended and immobilized HS, in batch incubations by two anaerobic consortia, was determined. HS were used as received, in suspended HS amended incubations. Meanwhile, HS used in immobilized HS amended incubations were previously immobilized on an ion exchange resin after a sulfonation process. Also, glucose consumption was measured during incubations, as well as volatile fatty acids (VFA) and hydrogen production (and consumption) due to glucose fermentation by the anaerobic consortia evaluated. From these experiments, it was possible to identify acetate and hydrogen as the main electron donors for HS reduction. The maximum reduction rate for suspended HS by PR and U, was 247 and 167 $\mu\text{Eq/g VSS-h}$, respectively. Moreover, the maximum reduction rate for immobilized HS by PR and U, were 95 and 55 $\mu\text{Eq/g VSS-h}$, respectively.

Subsequently, the second stage involved in the CT reductive bio-transformation process using HS was evaluated; namely, CT reduction by reduced HS. In consequence, HS were chemically reduced using hydrogen as reducing agent and palladium as catalyst. CT first-order reduction rates were estimated, once HS were chemically reduced. Suspended HS showed a greater CT first order reduction rate ($8.6 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$) than immobilized HS ($5.8 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$). Furthermore, CT was adsorbed on the ion exchange resin used as supporting material for HS immobilization, which accounted for 40% of the initial CT concentration (100 μM). On the other hand, CT reduction in incubations amended with suspended HS showed two phases. This was attributed to different semi-quinone radicals concentrations throughout incubation time, which led to an increase in the CT reduction rate. Also, chloroform (CF) was the only product from CT chemical reduction.

From these experimental data, it was possible to calculate the electron transfer rates in each stage of the CT reductive bio-transformation process. Those electron transfer rates, in suspended HS amended incubation, were 24.7 and $1.7 \times 10^{-2} \mu\text{Eq/L-h}$ for the first and second process stages, respectively. While the electron transfer rates, in immobilized HS amended incubations, were 9.5 and $1.2 \times 10^{-2} \mu\text{Eq/L-h}$ for the first and second process stages, respectively. Therefore, it was

concluded that CT reductive bio-transformation process is limited by electron transfer from reduced HS to CT. Another point to evaluate was the CT reduction by a humus-reducing consortium in the presence of suspended and immobilized HS. Here, consortia PR was used to biologically reduce HS, because of the better performance achieved in the first stage of the process in comparison to consortia U. In this case, CT first-order bio-reduction rate was 13.6-fold higher, in immobilized HS amended incubations ($1.5 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$) compared to suspended HS amended incubations ($1.1 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$), and 2.6-fold higher compared to CT chemical reduction rate in immobilized HS amended incubations ($5.8 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$). The limited reduction rate of CT in incubations amended with suspended HS was attributed to the CT initial concentration ($100 \mu\text{M}$), which was toxic for the inoculum studied. The greater reduction rate of CT achieved in incubations amended with immobilized HS, was attributed to the partial adsorption of CT on the ion exchange resin, which minimized CT toxic concentration effect on PR consortium. Moreover, CT adsorption on the ion exchange resin, perhaps improved the electron transfer between reduced HS and CT. Furthermore, CF was detected as the main product from CT bio-reduction, in both suspended and immobilized HS incubations.

The present study shows the feasibility to use immobilized HS to achieve the reductive bio-transformation of contaminants with electrophilic groups, such as polihalogenated solvents. This information is relevant to optimize its application in wastewater treatment systems.

1. Introducción

Las sustancias húmicas (SH) están compuestas por materia orgánica y son muy abundantes en el planeta, presentes en ecosistemas acuáticos y terrestres. Las SH contienen altas concentraciones de grupos quinona en su estructura y se ha comprobado su excelente función como catalizadores en procesos de oxidación y reducción de contaminantes. Los procesos de bio-transformación en los que están involucradas las SH incluyen reacciones abióticas y bióticas mediante el transporte de electrones favorecido por las quinonas presentes en las SH. Dentro de los procesos de transformación de contaminantes que se pueden llevar a cabo, por la transferencia de electrones que las SH favorecen, se encuentran la oxidación de contaminantes, la reducción de compuestos nitroaromáticos, la reducción de colorantes azo y la deshalogenación reductiva. Lo anterior, es posible gracias a que cuando las SH están reducidas los grupos quinona pueden donar sus electrones a los contaminantes, y a su vez, estas SH pueden reducirse de nueva cuenta si existe un donador de electrones disponible, o si la respiración anaerobia de SH está involucrada en el proceso. Todas las transformaciones de contaminantes capaces de ser catalizadas por las SH pueden ser llevadas a cabo mediante sistemas biológicos en los que los microorganismos utilizan las SH como aceptor o donador de electrones. Para reducir algún contaminante, las SH deben encontrarse en su forma reducida para poder donar los electrones a dicho contaminante (aceptor final), la reducción de las SH es llevada a cabo por microorganismos los cuales generalmente pueden reducir Fe(III). De este modo es posible desarrollar sistemas para lograr mayores tasas de bio-transformación de contaminante, ya sea oxidándolos o reduciéndolos, dependiendo de la configuración del proceso. Incluso es posible realizar la bio-transformación de dos contaminantes de manera simultánea cuando uno de ellos actúa como donador de electrones y el otro como aceptor final de electrones, en donde las SH y los microorganismos están de por medio. De lo anterior es factible que este tipo de procesos se apliquen en el tratamiento anaerobio de aguas

residuales, disminuyendo significativamente los tiempos de retención hidráulicos gracias al efecto catalítico de las SH. Por otro lado, la adición continua de SH en dichos procesos pudiese elevar los costos de operación, por lo que la inmovilización de las SH es un objetivo que se ha perseguido recientemente y que actualmente ya ha sido alcanzado por algunos investigadores. Queda claro que los logros obtenidos hasta ahora permiten desarrollar sistemas a gran escala para tratar aguas residuales, cuyas características demandan la reducción de contaminantes. No obstante, para que estos sistemas lleguen a tener un desempeño óptimo, es necesario saber qué aspectos limitan las etapas involucradas en el proceso. El proceso de mediación redox engloba dos etapas, una de las cuales puede ser la limitante, lo que estriba en la velocidad de cada una de ellas. La primera etapa es la capacidad que tienen los microorganismos para reducir las SH, dependiendo de la afinidad de los microorganismos por la composición de las SH a reducir. La segunda etapa es la reducción química del contaminante realizada por las SH reducidas, es posible que distintos tipos de SH reduzcan contaminantes a distintas velocidades, dependiendo de la composición de las SH. Es por lo anterior que el objetivo del presente estudio es evaluar los aspectos cinéticos en las etapas involucradas en la mediación redox lograda por las SH, centrándose en la deshalogenación reductiva, utilizando para ello dos inóculos anaerobios distintos, una sustancia húmica (suspendida e inmovilizada) y un contaminante prioritario: tetracloruro de carbono (CCl_4).

2. Marco teórico

2.1. Sustancias húmicas

Las SH se encuentran en el humus, el cual es formado a partir de la bio-transformación y re-polimerización de compuestos fenólicos y aromáticos como ligninas, taninos y metabolitos secundarios presentes en los desechos orgánicos. Las SH conforman el 10% del contenido total de suelos y sedimentos. Los registros de tiempos de residencia promedio de las SH demuestran que las variaciones de estos tiempos van desde los 250 hasta los 1900 años, dependiendo del lugar en donde fueron formadas (Stevenson 1994); lo anterior, indica la gran estabilidad y recalcitrancia que las SH poseen. Las SH están constituidas por compuestos orgánicos químicamente heterogéneos, los cuales poseen altos pesos moleculares, como los son las huminas, ácidos húmicos y fúlvicos (Stevenson 1994), además se encuentran ampliamente distribuidas en ecosistemas terrestres y acuáticos. Así mismo, las SH son resistentes a la degradación microbiana debido a que son compuestos sumamente estables (Lovley *et al.*, 1996). Las SH están constituidas por tres componentes básicos: huminas, ácidos húmicos y ácidos fúlvicos. Se cree que las SH están constituidas por un esqueleto formado por unidades de grupos alquilo y aromáticos, enlazadas por grupos funcionales que contienen oxígeno y nitrógeno con grupos funcionales mayores como ácidos carboxílicos, hidroxilos fenólicos y alcohólicos, cetonas y quinonas (Schulten *et al.*, 1991).

Algunos autores ya han reportado que las SH presentan ciertas funciones cuando interactúan con algunos microorganismos. Tales funciones son: 1) aceptor final de electrones para la respiración anaerobia microbiana, 2) donador de electrones y 3) mediador redox en bio-transformaciones reductivas (Field *et al.*, 2000).

La capacidad que las SH poseen para favorecer la transferencia de electrones, sugiere que los grupos funcionales de las SH, los cuales corresponden principalmente a las quinonas (Figura 2.1), son los que aceptan los electrones, resultando en hidroquinonas, las cuales son la forma reducida de las quinonas y que a su vez donan los electrones al aceptor final de electrones (Lovley *et al.*, 1996). Otra evidencia que señala a las quinonas como los grupos funcionales de las SH involucrados en la transferencia de electrones es la medición de radicales libres por resonancia del spin de electrones. Esta medición se llevó a cabo en SH en donde se demostró que las SH que poseen una alta capacidad como aceptor de electrones, también poseen un alto contenido de radicales libres, a diferencia de las que presentaron capacidades menores como aceptor de electrones. El espectro de resonancia medido fue consistente con la proporción de semiquinonas como los radicales orgánicos principales (Scott *et al.*, 1998).

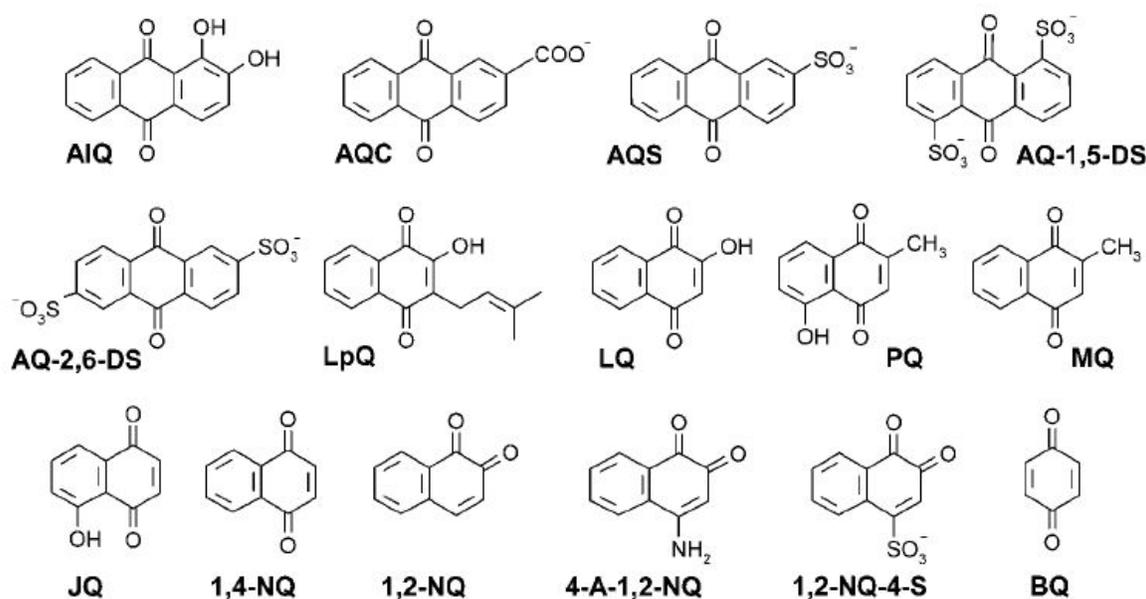


Figura 2.1 Estructuras de algunas quinonas modelo. AIQ, alizarina; AQC, antraquinona-2-carboxilato; AQS, antraquinona-2-sulfonato; AQ-1,5-DS, antraquinona-1,5-disulfonato; AQ-2,6-DS, antraquinona-2,6-disulfonato; LpQ, lapachol; LQ, lawsona; PQ, plumbagin; MQ, menadiona; JQ, juglona; 1,4-NQ, 1,4-naftoquinona; 1,2-NQ, 1,2-naftoquinona; 4-A-1,2-NQ, 4-amino-1,2-naftoquinona; 1,2-NQ-4-S, 1,2-naftoquinona-4-sulfonato; BQ, 1,4-benzoquinona.

2.2. Interacciones entre microorganismos y sustancias húmicas

Las SH han sido ampliamente estudiadas y ha sido posible identificar los principales roles que estas presentan en presencia de microorganismos. Las SH como aceptores finales de electrones fueron estudiadas evaluando la capacidad de distintos microorganismos de la familia *Geobacteraceae* para reducir SH en diversos ambientes (Coates *et al.*, 1998). La función de SH como donador de electrones para mantener el crecimiento microbiano de distintas especies también se ha observado y se demostró que el par redox de la quinona modelo 2,6-antraquinona disulfonada (AQDS/AHQDS) favoreció la transferencia de electrones entre *G. metallireducens* y *W. succinogenes*, así esta última obtiene electrones de la forma reducida de AQDS (Lovley *et al.*, 1999). Estas interacciones permiten la oxidación de compuestos al ser utilizados como sustrato (Cervantes *et al.*, 2000) o la reducción de compuestos debido a la mediación redox realizada por las SH (Encinas-Yocupicio *et al.*, 2006). Dicha reducción sería muy lenta o simplemente no se llevaría a cabo sin la presencia de las SH, pues se ha observado que la capacidad de las SH no se limita únicamente a favorecer la reducción de distintos compuestos; sino también, a acelerar en gran medida procesos de oxidorreducción (Curtis & Reinhard, 1994; Rau *et al.*, 2002). Convenientemente, los compuestos a reducir pueden ser contaminantes recalcitrantes prioritarios, cuyas características electrofílicas los hacen ser candidatos para una biotransformación en sistemas anaerobios a partir de las interacciones que se dan entre los microorganismos y las SH (Field *et al.*, 2000), pudiéndose así impedir los efectos tóxicos que estos contaminantes provocan.

Las SH exhiben tres roles durante la transferencia de electrones, para llevar a cabo la bio-transformación de contaminantes:

- a) Como aceptor final de electrones en la respiración microbiana, oxidando una gran variedad de compuestos orgánicos.
- b) Como mediador redox, para acelerar el transporte de electrones en procesos de oxidorreducción.

- c) Como donador de electrones, para mantener el crecimiento microbiano mediante la reducción de contaminantes más oxidados.

2.2.1. Sustancias húmicas como aceptores de electrones

La función de las SH como aceptores de electrones en la respiración microbiana fue observada por primera vez en un estudio en el que se encontró que *Geobacter metallireducens* fue capaz de usar SH como aceptores de electrones en la oxidación anaerobia de compuestos orgánicos e hidrógeno. En este caso, se utilizó la quinona modelo antraquinona-2,6-disulfonato (AQDS) (Lovley *et al.*, 1996). La reducción microbiana de la AQDS a su forma reducida antrahidroquinona-2,6- disulfonada (AHQDS) también incrementó la capacidad de los microorganismos para reducir compuestos menos accesibles, tales como óxidos de Fe(III). Lo anterior, ocasionó que la AHQDS se re-oxidara a AQDS, lo que le da a las SH la facilidad de ser regeneradas a sus formas oxidadas por óxidos metálicos (Figura 2.2), los cuales se encuentran presentes de manera natural en diferentes cuerpos de agua (Lovley *et al.*, 1996).

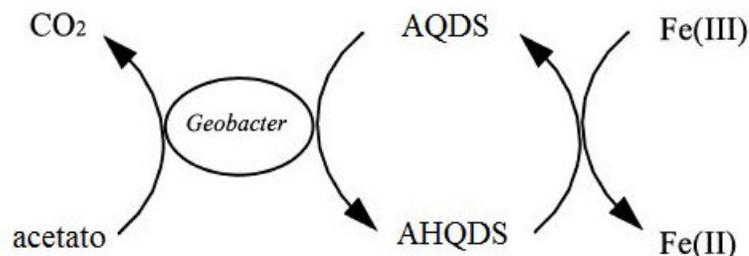


Figura 2.2 Mecanismo propuesto por Lovley *et al.*: AQDS como aceptor de electrones en la oxidación anaerobia de acetato por acción de *Geobacter* spp. y la re-oxidación de AHQDS a AQDS acoplada a la reducción de Fe(III).

Estudios posteriores reiteraron la capacidad de microorganismos para utilizar SH como aceptor de electrones, ya que se demostró que consorcios

anaerobios de diferentes orígenes, oxidaron distintos sustratos ecológicamente importantes con AQDS como aceptor final de electrones. Los sustratos incluyen hidrógeno, acetato y lactato, los cuales fueron oxidados gracias a la respiración microbiana de AQDS (Cervantes *et al.*, 2000). Adicionalmente, la oxidación anaerobia de contaminantes prioritarios como el tolueno es posible al utilizar SH como aceptor final de electrones (Cervantes *et al.*, 2001). La Tabla 2.1 muestra un resumen de contaminantes prioritarios, cuya oxidación anaerobia ha sido ligada a la reducción de SH o quinonas.

Tabla 2.1 Contaminantes prioritarios oxidados por vía anaerobia usando sustancias húmicas (SH) o AQDS como aceptor final de electrones.

Contaminante	SH	Inóculo	Referencia
Benceno	AH*	Sedimento anaerobio	Lovley <i>et al.</i> , 1996
Cloruro de vinilo	AH, AQDS*	Sedimento enriquecido	Bradley <i>et al.</i> , 1998
Dicloroetano	AQDS	Sedimento enriquecido	Bradley <i>et al.</i> , 1998
Fenol	AQDS	Lodos anaerobios	Cervantes <i>et al.</i> , 2000, 2008
p-Cresol	AQDS	Lodos anaerobios	Cervantes <i>et al.</i> , 2000, 2008
Tolueno	AHSAP, AQDS	Sedimentos enriquecidos	Cervantes <i>et al.</i> , 2001
MTBE*	AQDS, AH	Sedimento anaerobio	Finneran <i>et al.</i> , 2001
TBA*	AQDS, AH	Sedimento anaerobio	Finneran <i>et al.</i> , 2001

* AH: Ácidos húmicos; AQDS: 2,6-antraquinona disulfonada; MTBE: Metil terbutil éter, TBA: Terbutanol.

2.2.2. Sustancias húmicas como mediador redox en bio-transformaciones reductivas

Las SH no sólo funcionan como aceptores finales de electrones para llevar a cabo la oxidación de sustratos; también, se ha observado que las SH son capaces de llevar a cabo la reducción de especies químicas ambientalmente relevantes, lo que implica que las SH pueden actuar como reductores cuando éstas se encuentran reducidas (Cervantes *et al.*, 2000). Las SH pueden favorecer bio-transformaciones reductivas de distintos contaminantes como colorantes azo, compuestos nitroaromáticos y orgánicos halogenados, en donde la reducción es llevada a cabo gracias a que las SH pueden acarrear electrones desde un donador de electrones externo hacia un aceptor final (contaminantes con grupos

electrofílicos). En la Figura 2.3 se muestra el mecanismo general mediante el cual las SH actúan como mediadores redox.

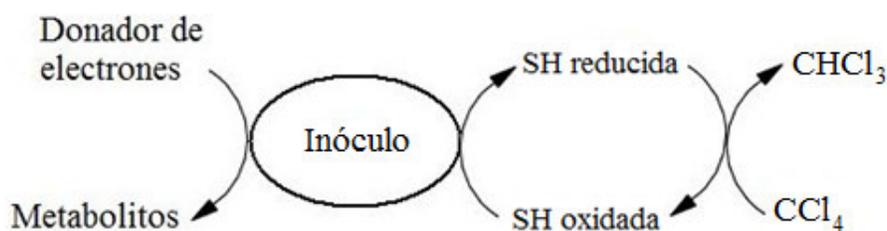


Figura 2.3 Mecanismo de mediación redox de SH.

A continuación se describen diferentes reacciones de oxidorreducción en los que se ha estudiado el efecto de mediadores redox.

a) Reducción de compuestos nitro-aromáticos

Se han realizado varios estudios, en los que se reporta que la materia orgánica natural juega un papel importante en la reducción de compuestos nitroaromáticos a sus correspondientes aminas aromáticas. En uno de ellos, se revelaron las cinéticas de transformación reductiva de una serie de nitro-bencenos y nitro-fenoles mono-sustituídos. Dichas transformaciones fueron llevadas a cabo en solución acuosa, en presencia de especies de sulfuro reducidas como donador de electrones, que además poseía pequeñas concentraciones de naftoquinona o porfirina, las cuales actuaron como mediadores redox. También, se observó que las tasas de reducción de los compuestos nitro-aromáticos pueden depender del tipo de mediador redox que esté involucrado en la reducción y de la configuración química del compuesto a reducir (Schwarzenbach *et al.*, 1990). Si bien en el anterior estudio, la investigación se centra en una reducción abiótica, recientemente también ha sido investigada la bio-transformación de compuestos nitro-aromáticos en presencia de mediadores redox. Por ejemplo, fue posible reducir nitraminas cíclicas por la acción de *Clostridium* sp. y SH como transportadores de electrones, en donde además el uso de éstas incrementó la

tasa de reducción de las nitraminas cíclicas (Bhusan *et al.*, 2006). En la Tabla 2.2 se enlistan los compuestos nitroaromáticos reducidos por la mediación redox favorecida por SH.

Tabla 2.2 Sustancias húmicas (SH) como mediadores redox para la reducción de compuestos nitroaromáticos

Donador de electrones	Sistema	Mediador Redox	Contaminante	Producto	Efecto	Referencia
HS ⁻	Abiótico	JQ, LQ	Cloronitrobenzenos	Anilinas	3 a 4 veces más rápido	Schwarzenbach <i>et al.</i> , 1990
HS ⁻	Abiótico	LQ	Cloronitrofenol	Anilina	3 a 4 veces más rápido	Schwarzenbach <i>et al.</i> , 1990
HS ⁻	Abiótico	MON	Nitrobenzenos	Anilinas	Fue posible reducir nitrobenzenos a distancias velocidades	Dunnivant & Shwarzenbach, 1992
Sacarosa	Biótico	AQDS	TNT	Aminas; 2,4-DHANT	Incremento en tasa de reducción	Borch <i>et al.</i> , 2005
NADH	Biótico	AQDS	HMX	Nitrito, Oxidos nitrosos, CO ₂ , Formaldehído	Incremento en tasa de reducción	Bhushan <i>et al.</i> , 2006
Acetato	Biótico	AQDS	RDX	CO ₂	Incremento de tasa de reducción y obtención de productos de bajo peso molecular	Kwon & Finneran, 2008

MON: materia orgánica natural; TNT: trinitrotolueno; HMX: hexahidro-1-nitroso-3,5-dinitro-1,3,5-triazina; RDX: hexahidro-1,3,-dinitroso-5-1,3,5-triazina.

b) Reducción de colorantes azo

De manera similar a la reducción de los compuestos nitroaromáticos, las SH también pueden favorecer el transporte de electrones hacia colorantes azo para acelerar su decoloración (Trump *et al.*, 2006). Se demostró que la AQDS aumentó significativamente la bio-reducción del colorante rojo reactivo 2. Además, en este caso, se demostró que la tasa de reducción fue proporcional a la concentración de AQDS utilizada (van der Zee *et al.*, 2001). Así mismo, la adición de mediadores redox en distintos cultivos de bacterias anaerobias y lodos no adaptados, incrementó la tasa de reducción del colorante azo amaranto (Rau *et al.*, 2002). Estos resultados son consistentes con los obtenidos en otros estudios llevados a cabo, en donde se observó que los mediadores redox son efectivos para transferir electrones y así permitir la reducción de colorantes azo. En la Tabla 2.3 se

muestran algunos casos en los que se reportan los efectos catalíticos de diferentes mediadores redox en la reducción de colorantes azo.

Tabla 2.3 Quinonas como mediadores redox para la reducción de colorantes azo.

Donador de electrones	Sistema	Mediador Redox	Colorante	Producto	Efecto	Referencia
Glucosa	Biótico	1,2-NQ, AQS	Amaranto	Aminas aromáticas	Decoloración hasta 10 veces más rápida	Keck <i>et al.</i> , 1997; Rau <i>et al.</i> , 2002
Glucosa	Biótico	AQS	Rojo ácido 1	Aminas aromáticas	La decoloración fue posible	Kudlich <i>et al.</i> , 1997
Glucosa	Biótico	AQS	Naftol azul negro	Aminas aromáticas	La decoloración fue posible	Kudlich <i>et al.</i> , 1997
Cátodo	Abiótico	AQS, AQDS	Amarillo vat 1	Decoloración	La decoloración fue posible	Bechtold <i>et al.</i> , 1999
HS ⁻	Abiótico	AQDS	Naranja ácido 7	Aminas aromáticas	Tasa de decoloración de 10 a 100 veces más rápida	van der Zee <i>et al.</i> , 2000
H ₂	Biótico	AQDS	Rojo reactivo 2	Aminas aromáticas	Incremento en la velocidad de decoloración	van der Zee <i>et al.</i> , 2001
Glucosa	Biótico	AQDS	Naranja ácido	Aminas aromáticas	Aprox. Aumentó 2 veces la tasa de decoloración	Encinas <i>et al.</i> , 2006
No menciona	Biótico	Antraquinona inmovilizada	Negro ácido 10B	Decoloración	Incremento en decoloración	Guo <i>et al.</i> , 2007
No menciona	Biótico	Antraquinona inmovilizada	Rojo reactivo brillante	Decoloración	Incremento en la tasa de decoloración	Guo <i>et al.</i> , 2007

c) Deshalogenación reductiva

La deshalogenación de compuestos poli-halogenados también puede ser promovida por la transferencia de electrones realizada por los mediadores redox. Los primeros resultados que confirmaron lo anterior, muestran que se logró llevar a cabo la reducción de los contaminantes hexacloroetano (C₂Cl₆), y tetracloruro de carbono (CCl₄) en solución acuosa utilizando SH como mediadores redox entre el donador de electrones (Fe(II) o HS⁻) y elceptor final de electrones, en este caso los contaminantes. Aunado a esto, la adición de SH a la solución acuosa provocó no sólo la reducción del contaminante, sino que además, aceleró la misma. Sin embargo, la reducción de los contaminantes ocurría de modo lento en la ausencia

de las SH en la solución acuosa (Curtis & Reinhard, 1994). En la Tabla 2.4 se resumen algunos ejemplos de procesos de deshalogenación reductiva y los efectos observados de mediadores redox.

Tabla 2.4 Sustancias húmicas (SH) como mediadores redox para la deshalogenación reductiva.

Donador de electrones	Sistema	SH	Contaminante	Producto	Efecto	Referencia
Fe(II), HS ⁻	Abiótico	AH	C ₂ Cl ₆	C ₂ Cl ₄	Aumento de 7 a 45 veces en la tasa de reducción	Curtis & Reinhard, 1994
Fe(II), HS ⁻	Abiótico	AH	CCl ₄	CHCl ₃	Aumento de hasta 18 veces en la tasa de reducción	Curtis & Reinhard, 1994
Fe(II), HS ⁻	Abiótico	AH	CHBr ₃	CH ₂ Br ₂	Reducción fue posible	Curtis & Reinhard, 1994
HS ⁻	Abiótico	JQ	C ₂ Cl ₆	C ₂ Cl ₄	Aumento de 10 veces en la tasa de reducción	Perlner <i>et al.</i> , 1996
Cátodo	Abiótico	AQDS	C ₂ Cl ₆	C ₂ Cl ₄	Aumento de hasta 50 veces en la tasa de reducción	Kappler & Haderlein, 2003
Sulfuro, Cisteína	Abiótico	AQDS	C ₂ Cl ₄	CHCl ₃	Aumento de 2 a 3 veces en la tasa de reducción	Doong & Chiang, 2005
Electrodo	Abiótico	Metilviologen	C ₂ HCl ₃	C ₂ H ₆	La reducción fue posible	Aulenta <i>et al.</i> , 2007
Lactato	Biótico	Cianocobalamina	CCl ₄	CHCl ₃	La reducción fue posible	Workman <i>et al.</i> , 1997
No identificado	Biótico	Catecol, protocatecuato	Octaclorodioxina	Tetraclorodioxina	Aumento de 4 a 6 veces la tasa de reducción	Barkovskii & Adriaens, 1998
Acetato	Biótico	AQDS	CCl ₄	CHCl ₃ , C ₂ Cl ₂ , Cl ⁻	Aumento de 6 veces en la tasa de reducción	Cervantes <i>et al.</i> , 2004
Ácidos grasos volátiles	Biótico	Vitaminas	CCl ₄	Cl ⁻	Aumento de hasta 13 veces en tasa de reducción	Guerrero-Barajas & Field, 2005

2.2.3. Sustancias húmicas como donadores de electrones

La posibilidad de que diferentes microorganismos, utilicen SH reducidas como donadores de electrones ya ha sido reportada. Bacterias reductoras de Fe(III), tales como *Geobacter metallireducens*, *Geothrix fermentans*, *Shewanella algae*, *Wolinella succinogenes* y *S. Barnesii*. Estas bacterias son capaces de oxidar SH reducidas utilizando nitrato o fumarato como aceptor final de electrones (Lovley *et al.*, 1999). Sumado a lo anterior, se ha estudiado el mecanismo mediante el cual, de manera simultánea, se puede llevar a cabo la oxidación de sulfuros y la producción de nitrógeno molecular usando SH como transportadores de electrones bajo condiciones desnitrificantes. En este caso, el sulfuro, al ser oxidado, reduce las SH, las cuales a su vez donan los electrones a los microorganismos que reducen al nitrato a nitrógeno molecular (Aranda-Tamaura *et al.*, 2007). De esta manera, es posible transformar dos contaminantes simultáneamente. Adicionalmente, las SH pueden actuar como transportadores de electrones entre dos microorganismos distintos, de los cuales uno oxida un sustrato y el otro reduce un aceptor final de electrones. Se demostró que *G. metallireducens* utiliza AQDS como aceptor de electrones al oxidar acetato a CO₂, al mismo tiempo la AQDS reducida dona sus electrones a *W. succinogenes* la cual reduce fumarato a succinato (Lovley *et al.*, 1999). De esta manera es posible mantener el crecimiento microbiano utilizando SH como transportadores de electrones (Figura 2.4).

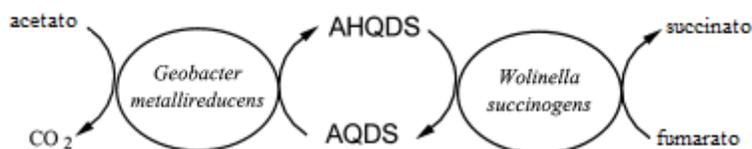


Figura 2.4 AHQDS como donador de electrones acoplado a la oxidación de acetato y reducción de fumarato.

2.3. Reducción biológica de sustancias húmicas

Un aspecto importante a tomar en cuenta dentro de los roles que las SH juegan en la bio-transformación de contaminantes, es la capacidad que presentan diversos microorganismos para reducirlas. Si bien es posible reducir las SH de forma exclusivamente química, ya sea haciéndolo a través de una reducción electroquímica o utilizando reductores químicos como el sulfuro (Kappler and Haderlein, 2003; Doong & Chiang, 2005) este enfoque puede no ser el adecuado si en algún momento se desea bio-transformar contaminantes mediante el uso de SH, pues el uso de dispositivos o reactivos para llevar a cabo la reducción de las SH pudiese incrementar los costos de operación y por tanto ocasionar desventajas. A partir de sustratos orgánicos de los cuales se pueden transferir electrones hacia las SH, debido a la acción metabólica de los microorganismos anaerobios, es posible llevar a cabo la reducción biológica de las SH. La glucosa puede ser utilizada como donador de electrones por microorganismos anaerobios, los cuales mediante la fermentación pueden formar diversos productos como acetato, formiato, etanol e hidrógeno, los cuales a su vez pueden ser donadores de electrones para llevar a cabo la reducción biológica de SH (Rittmann & McCarty, 2001). Lo anterior es por demás posible en escenarios en donde los responsables de la reducción de SH sean diversos tipos de microorganismos, como en el caso de consorcios anaerobios.

Se demostró por primera vez que las SH pueden desempeñarse como aceptores finales de electrones en la respiración microbiana anaerobia, en este caso se estudiaron los mecanismos de reducción de Fe(III) por los microorganismos *Geobacter metallireducens* y *Shewanella algae* (Lovley *et al.*, 1996). Durante el proceso de reducción las quinonas, presentes en la composición de las SH, sufren la transferencia de electrones resultando en la forma reducida de la quinona (la hidroquinona), generalmente existe un intermediario durante este proceso el cual es la semiquinona. Existen muchos microorganismos distintos capaces de reducir las SH, generalmente las SH actúan como aceptores finales de electrones o transportadores de electrones entre el microorganismo y un aceptor

insoluble más electropositivo que las SH; no obstante, las SH y quinonas también han exhibido interacciones redox con microorganismos exclusivamente fermentativos, lo que se considera como un proceso no respiratorio (Trump *et al.*, 2006).

Además la capacidad de las SH para aceptar electrones está directamente relacionada al número de quinonas que las SH contienen. Todos los microorganismos que pueden reducir las SH son capaces de transferir electrones a la quinona modelo AQDS, reduciéndola a AHQDS (Lovley *et al.*, 1996; Coates *et al.*, 1998). Por otro lado se han podido elucidar los mecanismos que permiten a los microorganismos hacer uso de las SH como aceptores finales de electrones. Se sabe que varios genes son los responsables directos o indirectos involucrados en la transferencia de electrones a la AQDS para su reducción. Uno de los primeros componentes que exhiben participación en la reducción de AQDS en la cadena transportadora de electrones de la membrana citoplasmática es la menaquinona. Esta vitamina es requerida para la transferencia de electrones hacia distintos aceptores de electrones, incluyendo el fumarato, nitrato, dimetil sulfóxido, Fe(III) y tiosulfato (Myers *et al.*, 2004).

Sin embargo, la capacidad que los microorganismos pueden tener para lograr la reducción de SH no es ilimitada, pues se sabe que quinonas involucradas cuyo potencial de óxido reducción (E_0') es menor al del cofactor NAD(P)H no pueden ser reducidas por los microorganismos, y al mismo tiempo, si estas quinonas presentan un E_0' mayor a -50 mV probablemente no poseen la capacidad de reducir con altas tasas la ruptura de los enlaces azo en colorantes (Rau *et al.*, 2002). En la Tabla 2.5 se muestran bacterias que son capaces de reducir SH, mientras que en la Tabla 2.6 se muestran microorganismos del grupo Archaea.

Tabla 2.5 Bacterias reportadas capaces de utilizar SH como aceptor de electrones.

Microorganismo	Donador de electrones	Aceptor de electrones	Referencia
<i>Geobacter metallireducens</i>	Acetato	AH, AQDS	Lovley <i>et al.</i> , 1996
<i>Shewanella alga</i>	Lactato, H ₂	AH, AQDS	Lovley <i>et al.</i> , 1996
<i>Desulfomonas acetoxidans</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Pelobacter propionicus</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Ceobacter chappellei</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Geobacter hydrogenophilus</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Geobacter sulfurreducens</i> JW-3	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Pelobacter venetianus</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Desulfomonas acetexigens</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Desulfomonas palmitatis</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Pelobacter acetylenicus</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Pelobacter carbinolicus</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Desulfobulbus propionicus</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Myxococcus xanthus</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Desulfuromusa succinioxidans</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Desulfuromosa bakii</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Desulfuromosa kysingii</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Pelobacter acidigallici</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Desulfosarcina variabilis</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Escherichia coli</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Lactato, propionato	AH	Benz <i>et al.</i> , 1998
<i>Lactococcus lactis</i>	Lactato	AH	Benz <i>et al.</i> , 1998
<i>Enterococcus cecorum</i>	Glucosa	AH	Benz <i>et al.</i> , 1998
<i>Lactococcus lactis</i>	Glucosa	AH	Benz <i>et al.</i> , 1998
<i>Thermoanaerobacter siderophilus</i> sp. nov.	Peptona	AQDS	Slobodkin <i>et al.</i> , 1999
<i>Thermus</i> SA-01	Lactato	AQDS	Kieft <i>et al.</i> , 1999
<i>Pantoea agglomerans</i> SP1	Acetato	AQDS	Francis <i>et al.</i> , 2000
<i>Deinococcus radiodurans</i> R1	H ₂	AQDS	Fredrickson <i>et al.</i> , 2000
<i>Methanobacterium thermoautotrophicus</i>	H ₂	AQDS	Lovley <i>et al.</i> , 2000
<i>Thermotoga maritima</i>	H ₂	AQDS	Lovley <i>et al.</i> , 2000
<i>Shewanella putrefaciens</i> CN32	Lactato de sodio	AQDS	Kukkadapu <i>et al.</i> , 2001
<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	Lactato, H ₂	AH	Cervantes <i>et al.</i> , 2002

Microorganismo	Donador de electrones	Aceptor de electrones	Referencia
<i>Sphingomona xenophaga</i> BN6	Glucosa	AQS, AQDS, LQ, LpQ	Rau <i>et al.</i> , 2002
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Glucosa	AQS, AQDS, LQ, LpQ, PQ	Rau <i>et al.</i> , 2002
<i>Ralstonia eutropha</i> 335	Glucosa	AQS, AQDS, LQ, LpQ	Rau <i>et al.</i> , 2002
<i>Hydrogenophaga palleronii</i>	Glucosa	AQS, AQDS, LQ, LpQ	Rau <i>et al.</i> , 2002
<i>Escherichia coli</i> K12	Glucosa	AQS, LQ, LpQ, PQ	Rau <i>et al.</i> , 2002
<i>Flexibacter filiformis</i>	Glucosa	AQS, AQDS, LQ, PQ	Rau <i>et al.</i> , 2002
<i>Bacillus subtilis</i>	Glucosa	AQS, AQDS, LQ, LpQ, PQ	Rau <i>et al.</i> , 2002
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Glucosa	AQS, AQDS, LQ, LpQ, PQ	Rau <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Glucosa	AQS, AQDS, LQ, LpQ	Rau <i>et al.</i> , 2002
<i>Desulfovibrio</i> G11	H ₂	AQDS	Cervantes <i>et al.</i> , 2002
<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i>	Acetato	AQDS	He & Standford, 2003
<i>Shewanella oneidensis</i>	NE	AQDS	Myers <i>et al.</i> , 2004
<i>Clostridium</i> sp. EDB2	NADH	AH, AQDS	Bhushan <i>et al.</i> , 2006
<i>Cellulomonas</i> sp. ES6	Sacarosa	AQDS	Borch <i>et al.</i> , 2005
<i>Geobacter metallireducens</i>	Acetato	AH, AQDS	Lovley <i>et al.</i> , 1996
<i>Shewanella alga</i>	Lactato, H ₂	AH, AQDS	Lovley <i>et al.</i> , 1996
<i>Desulfomonas acetoxidans</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Pelobacter propiunicus</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Ceobacter chapellei</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Geobacter hydrogenophilus</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Geobacter sulfurreducens</i> JW-3	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Pelobacter venetianus</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Desulfomonas acetexigens</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Desulfomonas palmitatis</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Pelobacter acetylenicus</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Pelobacter carbinolicus</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Desulfobulbus propionicus</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998

Microorganismo	Donador de electrones	Aceptor de electrones	Referencia
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Myxococcus xanthus</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Desulfuromusa succinioxidans</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Desulfuromosa bakii</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Desulfuromosa kysingii</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Pelobacter acidigallici</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
Microorganismo	Donador de electrones	Aceptor de electrones	Referencia
<i>Desulfosarcina variabilis</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Escherichia coli</i>	Acetato	AQDS	Coates <i>et al.</i> , 1998
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Lactato, propionato	AH	Benz <i>et al.</i> , 1998
<i>Lactococcus lactis</i>	Lactato	AH	Benz <i>et al.</i> , 1998
<i>Enterococcus cecorum</i>	Glucosa	AH	Benz <i>et al.</i> , 1998
<i>Lactococcus lactis</i>	Glucosa	AH	Benz <i>et al.</i> , 1998
<i>Thermoanaerobacter siderophilus</i> sp. nov.	Peptona	AQDS	Slobodkin <i>et al.</i> , 1999
<i>Thermus</i> SA-01	Lactato	AQDS	Kieft <i>et al.</i> , 1999
<i>Pantonea agglomerans</i> SP1	Acetato	AQDS	Francis <i>et al.</i> , 2000
<i>Deinococcus radiodurans</i> R1	H ₂	AQDS	Fredrickson <i>et al.</i> , 2000
<i>Pyrobaculum islandicum</i>	H ₂	AQDS	Lovley <i>et al.</i> , 2000
<i>Pyrodictium abyssi</i>	H ₂	AQDS	Lovley <i>et al.</i> , 2000
<i>Pyrococcus furiosus</i>	H ₂	AQDS	Lovley <i>et al.</i> , 2000
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	H ₂	AQDS	Lovley <i>et al.</i> , 2000
<i>Thermococcus celer</i>	H ₂	AQDS	Lovley <i>et al.</i> , 2000
<i>Methanopyrus kandleri</i>	H ₂	AQDS	Lovley <i>et al.</i> , 2000

Microorganismo	Donador de electrones	Aceptor de electrones	Referencia
<i>Methanococcus thermolithotropicus</i>	H ₂	AQDS	Lovley <i>et al.</i> , 2000
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	H ₂	AQDS	Lovley <i>et al.</i> , 2000
<i>Thermotoga maritima</i>	H ₂	AQDS	Lovley <i>et al.</i> , 2000
<i>Shewanella putrefaciens</i> CN32	Lactato de sodio	AQDS	Kukkadapu <i>et al.</i> , 2001
<i>Methanosarcina barkeri</i> MK	H ₂	AQDS	Bond & Lovley, 2002
<i>Methanococcus voltaie</i> A3	H ₂	AQDS	Bond & Lovley, 2002
<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	Lactato, H ₂	AH	Cervantes <i>et al.</i> , 2002
<i>Sphingomona xenophaga</i> BN6	Glucosa	AQS, AQDS, LQ, LpQ	Rau <i>et al.</i> , 2002
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Glucosa	AQS, AQDS, LQ, LpQ, PQ	Rau <i>et al.</i> , 2002
<i>Ralstonia eutropha</i> 335	Glucosa	AQS, AQDS, LQ, LpQ	Rau <i>et al.</i> , 2002
<i>Hydrogenophaga palleronii</i>	Glucosa	AQS, AQDS, LQ, LpQ	Rau <i>et al.</i> , 2002
<i>Escherichia coli</i> K12	Glucosa	AQS, LQ, LpQ, PQ	Rau <i>et al.</i> , 2002
<i>Flexibacter filiformis</i>	Glucosa	AQS, AQDS, LQ, PQ	Rau <i>et al.</i> , 2002
<i>Bacillus subtilis</i>	Glucosa	AQS, AQDS, LQ, LpQ, PQ	Rau <i>et al.</i> , 2002
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Glucosa	AQS, AQDS, LQ, LpQ, PQ	Rau <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Glucosa	AQS, AQDS, LQ, LpQ	Rau <i>et al.</i> , 2002
<i>Desulfovibrio</i> G11	H ₂	AQDS	Cervantes <i>et al.</i> , 2002
<i>Methanospirillum hungatei</i> JF1	H ₂	AQDS	Cervantes <i>et al.</i> , 2002
<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i>	Acetato	AQDS	He <i>et al.</i> , 2003
<i>Shewanella oneidensis</i>		AQDS	Myers <i>et al.</i> , 2004
<i>Clostridium</i> sp. EDB2	NADH	AH, AQDS	Bhushan <i>et al.</i> , 2006

Microorganismo	Donador de electrones	Aceptor de electrones	Referencia
<i>Cellulomonas</i> sp. ES6	Sacarosa	AQDS	Borch <i>et al.</i> , 2005

AH, Ácidos húmicos; AQS, 2-antraquinona sulfonada; AQDS, 2,6-antraquinona disulfonada; LQ, Lawsona; LpQ, Lapacol; PQ, Plumbagin; NE, No especificado.

Tabla 2.6 Archeobacterias capaces de utilizar SH como aceptor de electrones.

Microorganismo	Donador de electrones	Aceptor de electrones	Referencia
<i>Pyrococcus furiosus</i>	H ₂	AQDS	Lovley <i>et al.</i> , 2000
<i>Pyrobaculum islandicum</i>	H ₂	AQDS	Lovley <i>et al.</i> , 2000
<i>Pyrodictium abyssi</i>	H ₂	AQDS	Lovley <i>et al.</i> , 2000
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	H ₂	AQDS	Lovley <i>et al.</i> , 2000
<i>Thermococcus celer</i>	H ₂	AQDS	Lovley <i>et al.</i> , 2000
<i>Methanopyrus kandleri</i>	H ₂	AQDS	Lovley <i>et al.</i> , 2000
<i>Methanosarcina barkeri</i> MK	H ₂	AQDS	Bond & Lovley, 2002
<i>Methanococcus voltaie</i> A3	H ₂	AQDS	Bond & Lovley, 2002
<i>Methanospirillum hungatei</i> JF1	H ₂	AQDS	Cervantes <i>et al.</i> , 2002

2.4. Inmovilización de sustancias húmicas

La inmovilización de SH ha sido un objetivo perseguido por varios investigadores; sin embargo, este no ha sido relevante en cuanto al tratamiento de aguas contaminadas. Uno de los primeros estudios reportados describe diferentes técnicas para inmovilizar SH sobre distintos polímeros; en este caso, el objetivo del estudio fue comparar diferentes métodos para la inmovilización de SH. Se encontró que su inmovilización se lleva a cabo cuando los grupos hidroxilos de las SH reaccionan con grupos epóxido, presentes en diversos materiales poliméricos, siendo la inmovilización afectada por el tamaño y forma de los poros, de los polímeros utilizados en el estudio (Klavins & Apsite, 1997). Posteriormente, el mismo autor intentó injertar SH sobre distintos soportes investigando la capacidad que éstas tienen para actuar como sorbentes de sustancias orgánicas e

inorgánicas (Klavins & Eglite, 2002). Por otra parte también se logró inmovilizar mediadores redox sobre nanotubos de carbono de capa sencilla con el objetivo de modificar electrodos de grafito (Jeykumari *et al.*, 2005). Lo anterior hace evidente que es posible realizar la inmovilización de SH sobre materiales nano-métricos.

El aumento en la velocidad de procesos de decoloración y reducción de contaminantes que las SH disueltas propician ha sido estudiado en detalle (Schwarzenbach *et al.*, 1990; Curtis & Reinhard, 1994; Kudlich *et al.*, 1997). Sin embargo, apenas existen estudios sobre el efecto que las SH o quinonas inmovilizadas tienen sobre la decoloración y reducción de contaminantes. Literatura reportada al respecto describe la aceleración de la decoloración de colorantes azo usando quinonas inmovilizadas como mediadores redox (Guo *et al.*, 2007). El mediador redox utilizado fue una antraquinona, la cual se inmovilizó sobre tres soportes distintos: alginato de calcio, alcohol polivinílico y agar. Los efectos de varias condiciones de operación, tales como el número de cuentas de antraquinona inmovilizada, oxígeno disuelto, temperatura y pH fueron investigadas experimentalmente. Se encontró que la antraquinona inmovilizada incrementó la tasa de decoloración de 1.5 a 2 veces. Además, experimentos de reutilización de la antraquinona inmovilizada, mostraron que ésta puede ser reutilizada varias veces sin que la tasa específica de decoloración disminuya de manera significativa (Guo *et al.*, 2007).

Si bien estos experimentos muestran que es posible inmovilizar mediadores redox sobre diversos soportes; también, es factible que otros materiales, como el carbón activado, por sí solos puedan poseer propiedades redox, y por lo tanto, pueden funcionar como mediadores redox inmovilizados. Lo anterior, fue probado usando carbón activado como mediador redox para la reducción del colorante rojo reactivo 2 usando ácidos grasos volátiles como donadores de electrones. El uso de este carbón activado, en conjunto con lodo anaerobio, incrementó de manera importante la transformación del colorante, obteniéndose anilinas como producto final. Estos resultados comprueban que el carbón activado puede actuar como mediador redox al aceptar electrones y que esto puede ser explicado a la posible

presencia de grupos quinona en la superficie del carbón activado (van der Zee *et al.*, 2003).

De manera similar, se utilizó carbón activado para llevar a cabo la reducción del colorante azo, naranja ácido 7, en un reactor de lecho empacado con carbón activado. En donde se lograron altas tasas de conversión del colorante durante periodos cortos de tiempo, hasta 99% de reducción en 2 minutos, debido a la capacidad donadora de electrones y superficie específica del carbón activado (Mezohegyi *et al.*, 2007).

Recientemente, se crearon compositos con grupos funcionales poli-pirrol, preparados mediante la incorporación de la quinona modelo AQDS. A través de la electro-polimerización de monómeros de poli-pirrol sobre carbón activado. El composito resultante fue evaluado como catalizador, para llevar a cabo la bio-transformación de compuestos nitroaromáticos modelo, como el nitro-benceno y 2,4-dinitrotolueno. Los resultados mostraron que el composito mantuvo buena estabilidad y actividad catalítica, acelerando el proceso de reducción de los compuestos nitroaromáticos hasta sus respectivos productos amina (Li *et al.*, 2008).

Además, en otro estudio se evaluó la capacidad de diferentes resinas de intercambio iónico para adsorber distintos mediadores redox, bajo diferentes condiciones experimentales, con el fin de optimizar la inmovilización de al menos un mediador redox (sin afectar su reactividad) para su posterior aplicación en tratamientos de efluentes contaminados con colorantes azo. En donde se observó que la velocidad de reducción de los colorantes aumentó hasta 6.5 veces, dependiendo de la resina y del catalizador utilizados (García *et al.*, 2008).

2.5. Etapas en los procesos de bio-transformación reductiva en presencia de mediadores redox

Las etapas involucradas en procesos de reducción de compuestos en los que participan mediadores redox son dos: La reducción de SH por un donador de electrones o por un microorganismo, y la oxidación de SH reducidas por un aceptor final de electrones (Rau *et al.*, 2002). Actualmente, existen escasos estudios en la literatura en donde se hayan elucidado los aspectos que pueden limitar alguna de estas etapas dentro de los procesos de reducción. Por una parte se sabe que la capacidad que distintos microorganismos poseen para oxidar diferentes sustratos utilizando AQDS o ácidos húmicos como aceptor final de electrones puede variar, dependiendo de las condiciones de los sistemas biológicos. Lo anterior surge de un estudio en donde el objetivo no fue evaluar la capacidad de microorganismos para reducción reducir SH; no obstante, se reportan datos acerca de la capacidad de distintas bacterias para reducir AQDS o ácidos húmicos. Por ejemplo, se reportó que *Desulfitobacterium dehalogenans* reduce una mayor cantidad SH cuando utiliza lactato que cuando utiliza H₂ como donador de electrones, así el donador de electrones tiene un efecto directo sobre la capacidad del microorganismo para reducir las SH (Cervantes *et al.*, 2002). Por otro lado, en este mismo estudio, *Desulfovibrio* G11 logró reducir la misma cantidad de AQDS que *Methanospirillum hungatei* JF1 en un menor tiempo, ambos utilizando H₂ como donador de electrones y AQDS como la SH modelo (Cervantes *et al.*, 2002). Lo anterior, sugiere que hay microorganismos con mayor capacidad para reducir determinados mediadores redox de acuerdo a la configuración química de éstos.

Otro estudio, realizado de manera sistemática, tuvo por objetivo elucidar las etapas limitantes durante procesos de reducción de distintos colorantes, en presencia de diferentes mediadores redox. Se encontró que los resultados más significativos se produjeron evaluando la capacidad de *Sphingomonas xenophaga* BN6 y *Escherichia coli* K12 para reducir antraquinona-2-sulfonato (AQS) y lawsona (LQ), y a su vez la capacidad de estas quinonas para reducir químicamente el

colorante amaranto (Rau *et al.*, 2002). Se encontró que ambas bacterias son capaces de reducir las dos quinonas; sin embargo, las velocidades de reducción fueron distintas. *S. xenophaga* fue más afín a la AQS y *E. coli* a la LQ. Por otro lado, sólo se observaron bajas concentraciones de la forma reducida de la AQS durante la reducción del colorante amaranto; sin embargo, la concentración de AHQS se incrementó significativamente después de la transformación completa del colorante. Lo anterior, sugiere que la AQS reaccionó inmediatamente con el colorante después de ser reducida por *S. xenophaga*; por lo tanto, la etapa limitante fue la capacidad de *S. xenophaga* para reducir la AQS. Con respecto a la LQ, ésta última tuvo un incremento significativo de concentración en su forma reducida durante la reducción del colorante, lo que sugiere que la etapa limitante en este caso fue la capacidad de la LQ reducida para reducir químicamente el colorante amaranto (Rau *et al.*, 2002).

2.6. Contaminantes orgánicos halogenados

Los compuestos orgánicos halogenados son contaminantes ampliamente distribuidos en el aire, agua, suelo y sedimentos debido a descargas industriales o a manejos inadecuados durante su almacenamiento. Estos compuestos están conformados por moléculas recalcitrantes resistentes a la mineralización, debido a que el enlace carbono-halógeno es bastante estable. Por ser químicamente estables, los compuestos orgánicos halogenados son utilizados en diversos procesos industriales; sin embargo, estas mismas características los hacen difícilmente biodegradables una vez que son liberados al ambiente y en general, mientras más halogenados se encuentren, el proceso de degradación, es más lento.

Los compuestos orgánicos halogenados han sido ampliamente usados para diversos propósitos, en cientos de diferentes procesos industriales a lo largo de las

últimas décadas. Estos compuestos representan un peligro para la salud humana ya que se trata de toxinas, dioxinas, plaguicidas y policloruros de bifenilo (PCBs). Uno de los compuestos orgánicos halogenados más ampliamente utilizado es el plaguicida 1,1,1-Tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano (DDT), el cual se ha demostrado que se bioacumula en el tejido adiposo animal, además puede actuar como disruptor endócrino y dañar los ecosistemas (Kairu, 1994; Danzo, 1997). Así mismo, compuestos como los PCBs son utilizados en una gran variedad de aplicaciones industriales, en la producción de anticongelantes, lubricantes, plastificantes y colorantes; los cuales provocan efectos tóxicos en humanos y animales (Safe 1994.). Muchos de los compuestos orgánicos halogenados tienen toxicidad que va de moderada a alta cuando son inhalados. En gran medida esta toxicidad se debe a que estas sustancias no pueden ser metabolizadas por el organismo por lo que se acumulan en el tejido adiposo, ya que son solubles en grasas. La combustión de los compuestos orgánicos halogenados puede producir gases venenosos como el gas fosgeno y compuestos formados por combustión incompleta, los cuales se encuentran en la clasificación de compuestos que pueden causar cáncer (EPA 2008).

El gran problema con los compuestos orgánicos halogenados es que son contaminantes orgánicos persistentes, los cuales se bio-degradan lentamente. Anteriormente se pensaba que este tipo de compuestos no provenían de fuentes naturales y que, por lo tanto, no podían ser biodegradados; sin embargo, posteriormente, se descubrió que los compuestos orgánicos halogenados pueden provenir de fuentes como erupciones volcánicas y que de hecho la producción natural de compuestos como los fenoles clorados es mayor que la producción antropogénica. El hecho de que los compuestos orgánicos halogenados hayan existido por millones de años de manera natural ha permitido que diversos microorganismos hayan evolucionado y generado mecanismos que les permiten biodegradar dichos compuestos, lo que abre una posibilidad para su biotransformación (Fetzner, 1998).

2.6.1. Tetracloruro de carbono

El tetracloruro de carbono (TCC) es un compuesto organohalogenado que se encuentra en la lista de contaminantes prioritarios de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA). Este contaminante no ocurre de forma natural en el ambiente, es un líquido claro cuyo olor es dulce y puede ser detectado a bajos niveles. El TCC ha sido ampliamente utilizado como producto de limpieza y desengrasante. A nivel industrial, el TCC ha sido empleado en la síntesis de refrigerantes y como propulsor en latas de aerosol (ATSDR 2005). En la actualidad, muchos de los antiguos usos que el TCC poseía han sido prohibidos; sin embargo, este contaminante se encuentra presente en cuerpos de agua subterránea y sedimentos debido a la disposición incorrecta, fugas y derrames que ocurrieron durante el tiempo que fue usado. El TCC provoca diversos daños a la salud, dependiendo de la ruta de exposición. El edema pulmonar es un padecimiento común en humanos que se han expuesto a niveles letales de TCC en el aire; no obstante, la exposición por meses o años a concentraciones pequeñas de TCC (20 ppm) causa problemas recurrentes gastrointestinales en humanos como vómito, náuseas y dispepsia. Además, se sabe que el TCC, cuando es inhalado o ingerido, puede causar graves daños en el hígado, riñones y causar la depresión del sistema nerviosos central (ATSDR 2005).

El TCC es poco degradable bajo condiciones aerobias; no obstante, bajo condiciones anaerobias, la biotransformación de TCC es posible, en donde se necesitan 2 electrones para eliminar un cloro del TCC (Rittmann & McCarty, 2001). Lo cual se ha observado en cultivos metanogénicos (Egli *et al.*, 1987), en bacterias acetogénicas (Egli *et al.*, 1988), bacterias fermentativas (Galli & McCarty, 1989), bacterias sulfatorreductoras (Egli *et al.*, 1987) y bacterias reductoras de hierro (Picardal *et al.*, 1993). Bajo condiciones de reducción de hierro, la reducción de TCC a cloroformo es catalizada por la superficie reactiva del óxido metálico, formado por la adsorción biogénica de Fe(II) en óxidos de hierro (Kim & Picardal,

1999). Recientemente, la reducción TCC fue observada por un lodo anaerobio enriquecido, el cual utilizó SH para llevar a cabo la respiración. En este estudio, se reportó que la forma reducida de AQDS redujo e incrementó la tasa de reducción de TCC de manera directa obteniéndose cloroformo y diclorometano como producto final (Cervantes *et al.*, 2004). Lo anterior, sugiere que las SH juegan un papel importante en la reducción de compuestos orgánicos halogenados tales como el TCC.

3. Justificación

El uso de las SH como mediadores redox para llevar a cabo biotransformaciones reductivas de diversos contaminantes, como compuestos nitroaromáticos, orgánicos halogenados y colorantes azo ha sido ampliamente reportado (Schwarzenbach *et al.*, 1990; Kudlich *et al.*, 1997; Curtis & Reinhard, 1994). Aunado a esto, la inmovilización de SH sobre distintos soportes ya ha sido lograda (Klavins & Apsite, 1997, Guo *et al.*, 2007), por lo que la aplicación conjunta de consorcios anaerobios y SH como mediadores redox para el tratamiento de aguas contaminadas con este tipo de compuestos es posible. Sin embargo, se ha reportado que el proceso de mediación redox que las SH proporcionan puede estar limitado por dos etapas (Rau *et al.*, 2002): 1) La capacidad de los microorganismos para reducir las SH y 2) la velocidad con la que las SH reducidas reducen químicamente los contaminantes (aceptor final de electrones). Por estas razones, es necesario elucidar los mecanismos que pueden limitar esas etapas, para poder diseñar sistemas de tratamiento que presenten los mejores desempeños posibles.

Para lo anterior se propone llevar a cabo la caracterización de dos consorcios anaerobios distintos, para evaluar la capacidad de cada uno de ellos para reducir sustancias húmicas, utilizando glucosa como donador de electrones. Dichas SH serán inmovilizadas sobre una resina de intercambio iónico. Posteriormente, se evaluará la capacidad de ambos consorcios anaerobios para reducir las SH, y se hará un estudio por separado para evaluar la capacidad de las SH reducidas inmovilizadas para transferir electrones al TCC para propiciar su deshalogenación. De estos experimentos se obtendrán datos cinéticos que permitan elucidar las etapas limitantes durante la deshalogenación reductiva del TCC. Dicha información será de utilidad para diseñar sistemas de tratamiento para su posterior aplicación en aguas contaminadas por TCC.

3.1. Objetivos

- Objetivo general

Elucidar las etapas limitantes involucradas en el proceso de deshalogenación reductiva de TCC, utilizando SH suspendidas e inmovilizadas como mediadores redox, por diferentes consorcios anaerobios.

- Objetivos particulares
- Evaluar la capacidad de dos consorcios anaerobios para reducir SH suspendidas e inmovilizadas mediante cinéticas en cultivo en lote.
- Evaluar la capacidad de SH, reducidas químicamente, para reducir el TCC por medio de cinéticas realizadas en cultivo en lote.
- Evaluar la reducción biológica de TCC en presencia de SH como mediadores redox.

3.2. Hipótesis

La etapa limitante en la biotransformación reductiva de TCC, es la reducción del TCC por acción de las SH reducidas.

4. Materiales y Equipo

4.1. Materiales

Consortios anaerobios: Consorcio anaerobio UAM (A), proporcionados por la Universidad Autónoma Metropolitana. Obtenidos de un suelo contaminado por derrame de hidrocarburos, cuya procedencia no fue revelada.

Consortio anaerobio Poza Rica (B), obtenidos de un suelo contaminado por hidrocarburos en el estado de Veracruz.

Sustancias húmicas: Leonardita obtenida de la International Sociedad internacional de sustancias húmicas (IHSS, por sus siglas en inglés). La Leonardita es producida por la oxidación natural de lignita expuesta (carbón de bajo grado). La muestra de Leonardita de la IHSS fue obtenida de la mina Gascoyne en el condado de Bowman, Dakota del Norte. La composición elemental de Leonardita en base seca (% en peso) es la siguiente: H₂O, 10.9%; cenizas, 13%; C, 49.2%; H, 4.52; N, 0.9%.

Resina de intercambio iónico: Amberjet 4600 (Rohm and Haas).

4.2. Equipo

Los instrumentos y equipos utilizados en el presente estudio se muestran en la tabla 4.1.

Tabla 4.1 Equipos e instrumentos utilizados.

Equipo	Marca	Modelo
Incubadora orbital	ESEVE	INO 65V-7
Equipo de electroforesis capilar	Agilent	CE
Potenciómetro	Termo Scientific	Orion 5 star

Equipo	Marca	Modelo
Autoclave	Yamato	SM510
Centrífuga	Labnet	24D
Centrífuga	Thermo IEC	CentraCL2
Centrífuga	Sorvall	RC5CPlus
Espectrofotómetro	Termo Scientific	Genesys 10UV
Cromatógrafo de gases	Agilent Technologies	6890N
Analizador de carbón orgánico total	Shimadzu	TOC-VCSN
Liofilizador	Labconco	-

5. Metodología

5.1. Caracterización de los consorcios

Se utilizaron como consorcios 2 muestras de suelos contaminados por hidrocarburos. En la Tabla 5.1, se muestra información de cada uno de los consorcios anaerobios.

Tabla 5.1 Consorcios microbianos empleados en la investigación.

Consortio	Tipo de inóculo	Procedencia
UAM	Suelo	Suelos contaminados por hidrocarburos, procedencia desconocida
Poza Rica	Suelo	Suelos contaminados por hidrocarburos en Poza Rica, Veracruz.

La caracterización de los inóculos consistió en la determinación de los sólidos totales y volátiles. También se determinó la producción de biogás, mediante cromatografía de gases. El medio mineral utilizado fue el descrito por Cervantes *et al.*, 2007, adicionando glucosa como sustrato. El pH del medio fue controlado a 6.7 ± 0.2 por el bicarbonato añadido y un espacio de cabeza compuesto de N₂/CO₂ (80%/20%).

Los resultados obtenidos de la determinación de sólidos suspendidos volátiles y totales de los Consorcios anaerobios UAM y Poza Rica, son presentados en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2 Resultados de la caracterización de los inóculos.

Consortio anaerobio	% Sólidos fijos	% Sólidos suspendidos volátiles
UAM (U)	86.73	8.08
Poza Rica (P)	85.22	8.43

5.2. Sulfonación de sustancias húmicas

La Leonardita fue sometida a sulfonación para incorporar grupos SO_3H en la estructura de la misma, para permitir una mejor inmovilización sobre la resina de intercambio iónico. El agente sulfonante utilizado fue ácido cloro-sulfónico (ClSO_3H), ya que éste demostró ser un agente más eficiente que otros, lográndose la introducción de 1.6 mmol de SO_3H por gramo de Leonardita en un estudio previo (Yudov *et al.*, 2005).

Para llevar a cabo la sulfonación se pesó una muestra 300 g de leonardita, la cual fue secada a 70°C , posteriormente fue enfriada colocándola en un vaso de precipitados en un baño frío. En total, se añadieron 600 mL de ClSO_3H enfriado en pequeñas porciones bajo constante agitación durante 6 horas. Cuando la reacción se completó, la mezcla fue vertida en 12 L de agua destilada helada para hidrolizar el resto del ClSO_3H y la solución obtenida se dejó reposar por 10 horas. Posteriormente, el sobrenadante fue descartado y el precipitado fue lavado 6 veces, posteriormente se purificó mediante diálisis y finalmente fue liofilizado y molido para obtener partículas menores a $250\ \mu\text{m}$ con el fin de adquirir partículas homogéneas.

5.3. Inmovilización de sustancias húmicas

Después de concluir el proceso de sulfonación, se preparó una solución de leonardita sulfonada con agua destilada, a una concentración de 18 g /L ajustando el pH a 11 usando NaOH al 5%. Dicha solución se mantuvo en agitación constante (180 rpm) durante 24 horas. Se tomaron muestras de 5 mL al inicio y al final de las 24 horas para la determinación de carbón orgánico total presente en la solución (COT). Al finalizar el tiempo de preparación, se ajustó el pH de la solución a 7 (utilizando HCl al 5%). Posteriormente, se agregaron 20 g de resina (previamente

secada a 50°C durante 10 minutos y tamizada para obtener partículas mayores a 250 µm), por cada litro de solución de acuerdo a la relación 1 mL solución/0.02 g resina, para llevar a cabo la inmovilización de la Leonardita sobre la resina.

A continuación la solución de leonardita sulfonada y resina se mantuvo bajo agitación constante (180rpm) durante 24 horas. Una vez terminado el proceso de inmovilización se tomó una muestra de solución de 5 mL para determinar el COT de la solución; posteriormente, la solución fue descartada mediante filtración, y la resina se enjuagó con agua destilada hasta que el agua no presentó coloración. Después, la resina fue adicionada a un volumen de agua destilada, igual al de la solución, en donde se llevó a cabo la inmovilización y se mantuvo en agitación (180 rpm) por 24 horas. A continuación, el agua fue descartada mediante filtración y la resina fue lavada varias veces utilizando el medio basal anteriormente descrito. Después, la resina fue adicionada a medio basal con un volumen igual al utilizado para la inmovilización durante 24 horas, con el objetivo de verificar la ocurrencia de desorción de las SH inmovilizadas. Se tomaron muestras de 5 mL al inicio y final del periodo de desorción para determinar el COT del medio basal.

Para estimar la cantidad máxima adsorbida de SH sobre la resina, se realizaron análisis de COT en el equilibrio de la solución empleada para la inmovilización, al inicio y final de la inmovilización. La cantidad máxima adsorbida se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$q_{sd} = \frac{V(C_i - C_f)}{g_r}$$

Donde:

q_{sd} = Cantidad máxima de SH adsorbida sin desorción, mg COT/g resina

V = Volumen de la solución de inmovilización, L

C_i = Concentración inicial de COT en la solución de inmovilización, mg COT

C_f = Concentración final de COT en la solución de inmovilización, mg COT

g_r = Gramos de resina adicionados a la solución de inmovilización, g

Finamente, se determinó la desorción, de las SH inmovilizadas, en el medio mineral. Mediante un análisis de COT, al principio y al final del proceso de desorción. Se comprobó, que no ocurrió la desorción de las SH inmovilizadas, puesto que la concentración de COT al final del proceso de desorción fue igual que la registrada al principio del proceso.

5.4. Cinéticas de reducción biológica de sustancias húmicas

La reducción biológica de Leonardita fue evaluada mediante cinéticas desarrolladas en cultivos en lote para cada uno de los consorcios estudiados. Se prepararon dos conjuntos de experimentos, el primero para la reducción de leonardita suspendida y el segundo para la reducción de leonardita inmovilizada, utilizando ambos consorcios en los dos conjuntos de experimentos bajo las mismas condiciones. Los controles utilizados en ambos experimentos fueron: control biológico, sin adición de leonardita suspendida o inmovilizada (sólo resina); químico, sin la adición de consorcio anaerobio; endógeno, sin la adición de sustrato; estéril, adicionando consorcio anaerobio esterilizado mediante autoclave y sin la adición de sustrato. Se utilizaron botellas serológicas sacrificables de 60 mL. La composición del medio mineral usado en todas las incubaciones fue (g/L): NaHCO_3 (1.68); NH_4Cl (0.3); KH_2PO_4 (0.2); $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.03); CaCl_2 (0.1); Na_2S (0.1); y 1 mL 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); $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (162); EDTA (1000) y 1 mL/L de HCl (36%).

En las botellas serológicas, se añadieron 30 mL de medio mineral descrito, (mediante el cual se aseguró la prevalencia de pH neutro durante las incubaciones, por el sistema buffer $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$) y glucosa como sustrato a una concentración de 300 mg/L, adicionando una concentración de 0.1 g/L de SSV de

consorcio anaerobio UAM o Poza Rica, una concentración de 1.2 g COT/L de SH suspendida o inmovilizada (el 60% de Leonardita está constituido por COT). Las botellas serológicas fueron selladas herméticamente con tapón de hule y sello de aluminio. Se realizó el cambio y purga de atmósfera de las botellas serológicas utilizando una mezcla gaseosa con composición de N₂/CO₂ (80%/20%). Debido a que la técnica para analizar las SH reducidas no permite la continuación de la cinética en las botellas serológicas, éstas tuvieron que ser sacrificadas, por lo que se preparó una botella para cada uno de los puntos a medir por cada uno de los controles de las cinéticas. Todas las cinéticas de reducción se hicieron por duplicado.

Las botellas serológicas fueron incubadas en una incubadora orbital a 25 °C y 160 rpm. La medición de leonardita reducida se monitoreó mediante el reactivo ferrozina [4,4'-[3-(2-piridinil)-1,2,4-triazina-5,6-dil]bis-sal mono-sódica) cada 12 horas para las SH suspendidas y cada 24 horas para las SH inmovilizadas. La ferrozina se enlaza a Fe(II) y Fe(III), pero se obtiene un complejo coloreado sólo con Fe(II) (Burlage *et al.*, 1998). Debido a lo anterior los controles a cada punto de monitoreo se hicieron reaccionar con citrato férrico 13 mM (exceso) para llevar a cabo la reducción de Fe(III) a Fe(II), presente en el citrato férrico, durante 1 y 2 horas, para los conjunto de SH suspendidas e inmovilizadas respectivamente, a 160 rpm. Así, el Fe(II) fue determinado al realizar una extracción ácida de las botellas serológicas empleando HCl 0.5 M y añadiendo el extracto después a una solución de ferrozina amortiguada con [4-(2-hidroxietil)piperazina-1-ácido etano-sulfónico] (HEPES). Después de estar en reposo durante 15 minutos y ser centrifugada, la muestra fue medida por espectrofotometría a una longitud de onda de 562 nm para determinar su absorbancia (Burlage *et al.*, 1998). De esta manera se pudo medir indirectamente la reducción de leonardita por la medición de Fe(II) presente en la muestra. La tasa máxima de reducción de SH fue calculada a partir de la pendiente máxima observada en regresiones lineales, con al menos tres puntos y un r² mayor a 0.9 (Cervantes *et al.*, 2007)

La composición del biogás producido durante las cinéticas se midió a la par de la reducción de leonardita mediante cromatografía de gases, utilizando un cromatógrafo de gases con detector de conductividad térmica. También se monitoreó el consumo de glucosa y producción de ácidos grasos volátiles (AGVs) como acetato, lactato y butirato durante las cinéticas, el cual fue medido por electroforesis capilar. Todos los datos obtenidos fueron reportados en mili-equivalentes de electrones por litro (mEq/L) con el fin de realizar los respectivos balances y reducción de SH de cada una de las cinéticas.

5.4.1. Curvas de calibración

Las curvas de calibración para la determinación de hidrógeno producido, y Fe(II), se muestran en las Figuras 5.1 y 5.2. Además, en las Figuras 5.3, 5.4 y 5.5, se muestran las curvas de calibración para los AGVs y glucosa.

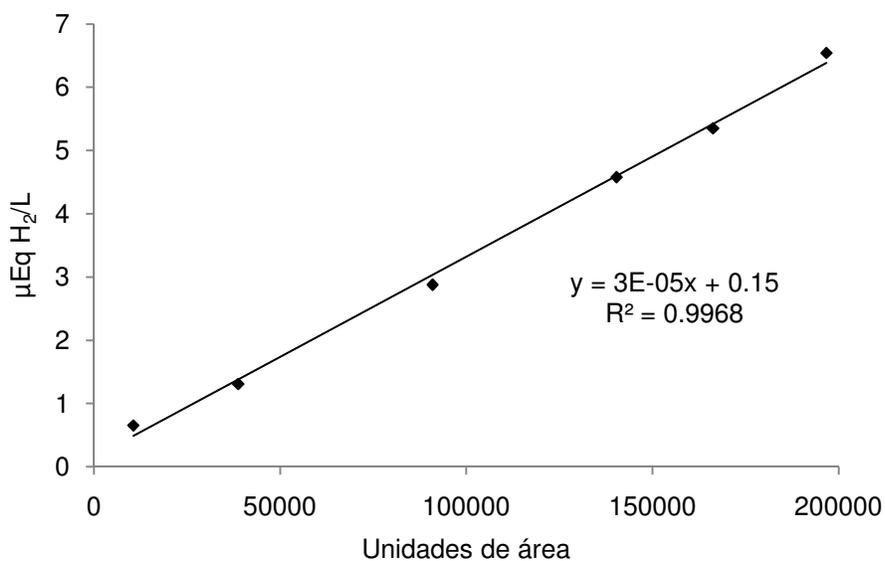


Figura 5.1 Curva de calibración de H₂ por cromatografía de gases.

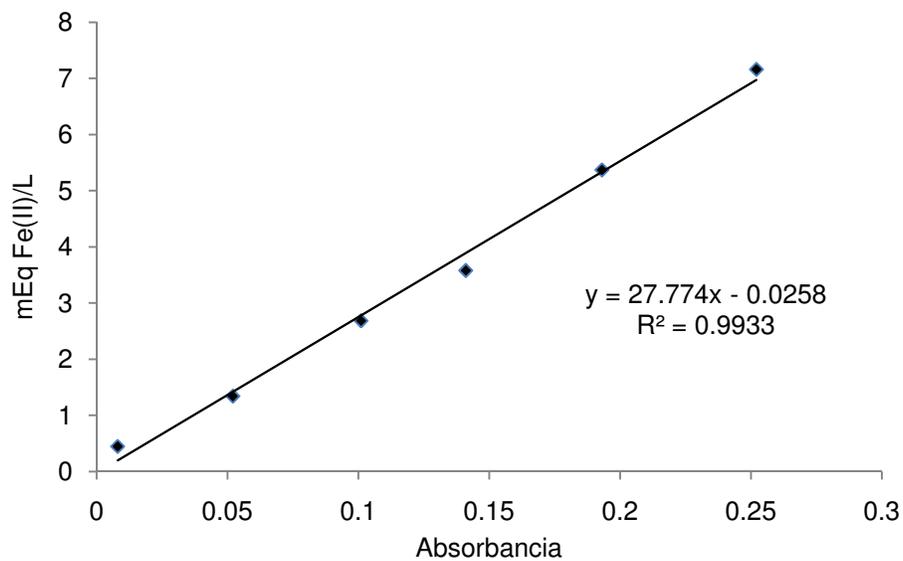


Figura 5.2 Curva de calibración de Fe(II) por espectrofotometría ($\lambda = 562 \text{ nm}$)

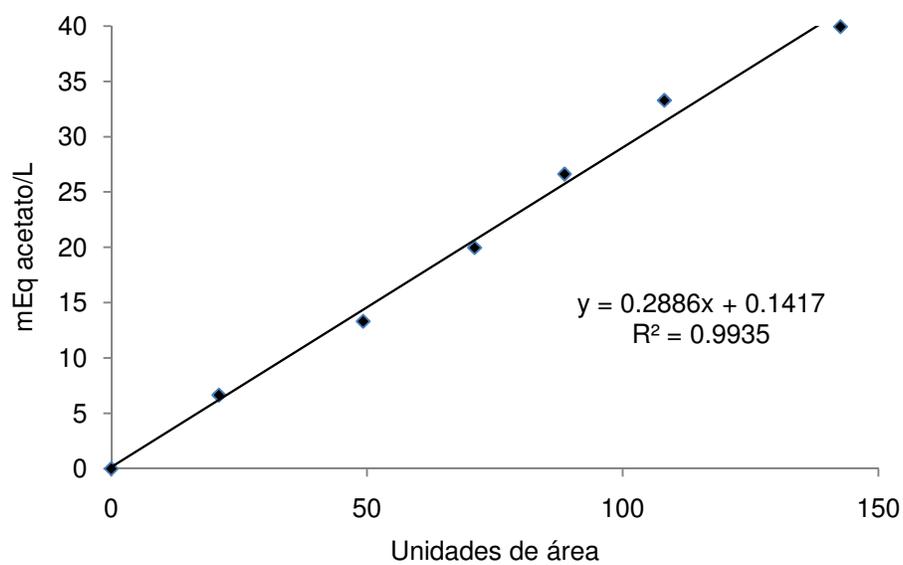


Figura 5.3 Curva de calibración de acetato por electroforesis capilar.

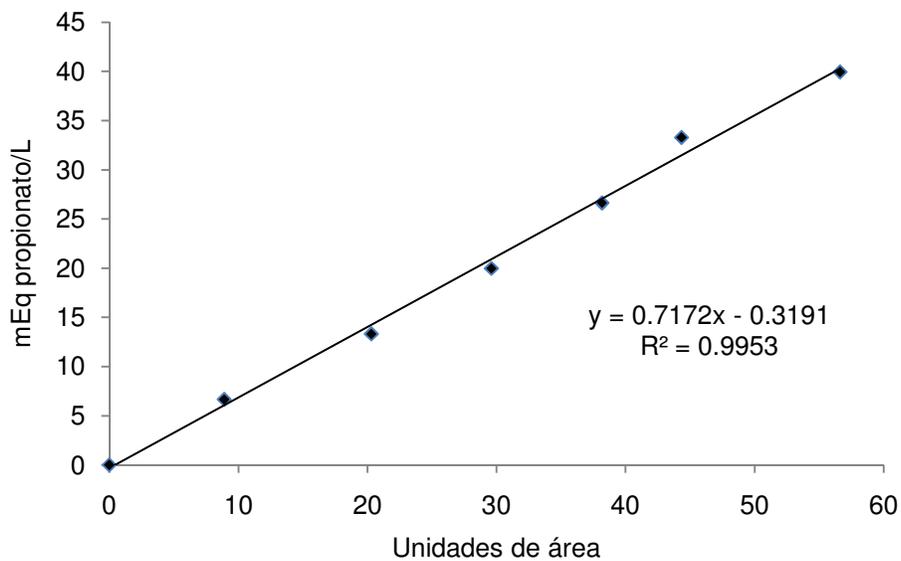


Figura 5.4 Curva de calibración de propionato por electroforesis capilar.

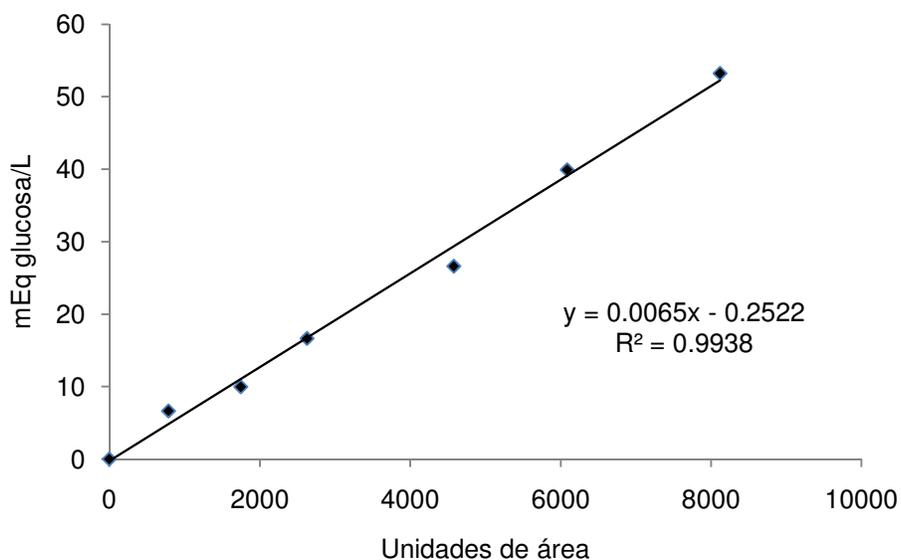


Figura 5.5 Curva de calibración de glucosa por electroforesis capilar.

5.5. Reducción química de las sustancias húmicas

De aquí en adelante, se usaron SH suspendidas, las cuales ya habían sido previamente sulfonadas, debido a la carencia de SH parentales. Las SH fueron reducidas químicamente utilizando hidrógeno. Para lo anterior, se prepararon las

botellas serológicas (60 mL) necesarias, conteniendo 1.2 g COT/L de SH en 30 mL del medio mineral estéril, anteriormente descrito. Se agregaron también partículas de paladio (150 mg/L), como catalizador para la reducción química mediante hidrógeno. Posteriormente, las botellas serológicas fueron selladas herméticamente con tapón de teflón y sello de aluminio. Después se intercambió la atmósfera, en la fase gaseosa y acuosa de las botellas serológicas, utilizando una mezcla gaseosa de H₂/CO₂ (80%/20%) durante 40 minutos, para asegurarse de que todo el oxígeno fuese expulsado de las botellas. A las 72 horas, se determinó la capacidad aceptora de electrones de las SH reducidas químicamente, mediante la técnica de la ferrozina anteriormente descrita. Lo anterior, de un triplicado de botellas serológicas preparadas exclusivamente para la determinación de la capacidad aceptora de electrones de las SH.

Posteriormente, dentro de una cámara anaerobia con mezcla H₂/N₂ (95%/5%), las botellas serológicas conteniendo las SH reducidas químicamente, se abrieron para poder filtrar la solución y separar las partículas de paladio adicionadas. A continuación, las botellas serológicas fueron selladas nuevamente y se realizó el intercambio de atmósfera con una mezcla gaseosa de N₂/CO₂ (80%/20%). Quedando de esta manera, listas para llevar a cabo las cinéticas de deshalogenación de TCC.

5.6. Cinética de reducción química de tetracloruro de carbono

La cinética de reducción química de TCC se llevó a cabo mediante experimentos en lote, por duplicado, en botellas serológicas de 60 mL. Se prepararon dos conjuntos de experimentos, uno con SH inmobilizadas y otro con SH suspendidas (1.2 g COT/L). Para ambos conjuntos de experimentos se preparó un control con SH químicamente reducidas y un control con SH sin reducir (oxidadas). Se utilizó un volumen de trabajo de 30 mL, el cual consistió del medio

mineral anteriormente descrito (mediante el cual se aseguró la prevalencia de pH neutro durante las incubaciones, por el sistema buffer $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$). La concentración inicial de TCC, para la cinética de reducción química, fue $100 \mu\text{M}$, la cual fue obtenida a partir de una solución madre 3 mM , de la cual se inyectó el volumen requerido a cada botella serológica (previamente preparada) para obtener la concentración inicial deseada. Las botellas serológicas se mantuvieron en agitación a 160 rpm y a una temperatura de 25 C . La cinética de reducción química de TCC fue evaluada mediante cromatografía de gases utilizando un detector de captura de electrones. Así, se monitoreó la desaparición de TCC y la aparición de cloroformo (CHCl_3) y diclorometano (CH_2Cl_2) como productos de la deshalogenación de TCC, debido a la reducción química por las SH. Se realizó una medición a la hora cero, para corroborar que la concentración inicial de TCC fuera la deseada, posteriormente se realizaron mediciones cada 24 horas hasta la finalización de la cinética. Además, al final de la cinética se determinó la cantidad de ión cloruro (Cl^-) presente en el medio mineral mediante electroforesis capilar. Se calculó la tasa de deshalogenación de TCC (K) a partir de la pendiente, la cual se consideró de primer orden al ser r^2 mayor a 0.90.

5.7. Cinética de reducción biológica de tetracloruro de carbono en presencia de sustancias húmicas

La reducción biológica de TCC fue evaluada mediante cinéticas de deshalogenación en experimentos en lote (por duplicado) utilizando SH como mediadores redox. Se prepararon 2 conjuntos de experimentos, uno con SH inmovilizadas y otro con SH suspendidas, la concentración de SH tanto inmovilizadas como suspendidas fue de 0.12 g COT/L de SH. Se utilizaron botellas serológicas de 60 mL con un volumen de trabajo de 30 mL , el cual consistió del medio mineral anteriormente descrito (mediante el cual se aseguró la prevalencia

de un pH neutro durante las incubaciones, por el sistema buffer $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$, con 0.1 g SSV/L del consorcio anaerobio PR, con 300 mg/L de glucosa como sustrato. Para cada conjunto de experimentos se preparó un control sin SH y un control endógeno. Las botellas fueron selladas con tapón de teflón y sello de aluminio, se realizó el intercambio de atmósfera a una mezcla gaseosa de N_2/CO_2 (80%/20%). Las botellas fueron incubadas a 160 rpm y a 25 C en una incubadora orbital. Después de 12 horas se añadió una concentración de 50 μM de TCC. La desaparición de TCC y, aparición de CHCl_3 y CH_2Cl_2 durante la cinética se determinó por cromatografía de gases utilizando un detector de captura de electrones. Al adicionar el TCC, se realizó una medición a la hora cero y posteriormente cada 7 y 24 horas hasta el final de las cinéticas. Además, se midió la cantidad de ión cloruro (Cl^-) al final de las cinéticas mediante electroforesis capilar, y se determinó la aparición de otros posibles subproductos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. También, se determinó el grado de reducción de las SH al final de las cinéticas mediante la técnica de la ferrozina descrita anteriormente.

5.8. Adsorción de tetracloruro de carbono en resinas de intercambio iónico

Debido a la utilización de una resina de intercambio iónico como soporte para las SH, se realizaron curvas de calibración de TCC, CHCl_3 y CH_2Cl_2 bajo diversas condiciones para determinar la cantidad de estos solventes que fue adsorbida sobre la resina de intercambio iónico. Las curvas de calibración se prepararon sin SH, con SH suspendidas y con SH inmovilizadas. A partir de las curvas de calibración obtenidas se pudo comprobar que aproximadamente 40% (± 5.57) de la concentración añadida de TCC fue adsorbida sobre la resina de intercambio iónico para cada uno de los puntos preparados para las curvas de calibración y de acuerdo a las áreas registradas por el equipo, mientras que para

CHCl₃ la adsorción también fue de 40%; sin embargo, presentó una desviación estándar mayor, ±13.20%. Finalmente la adsorción de CH₂Cl₂ fue de 60% en cada uno de los puntos de la curva con una desviación estándar de (±3.16%). La curva de calibración con SH suspendidas no presentó diferencia en comparación a la curva de calibración sin SH, por lo que se concluyó que la adsorción de los solventes en las SH es nula. En las Figuras 5.6, 5.7 y 5.8, se muestran las curvas de calibración de los solventes.

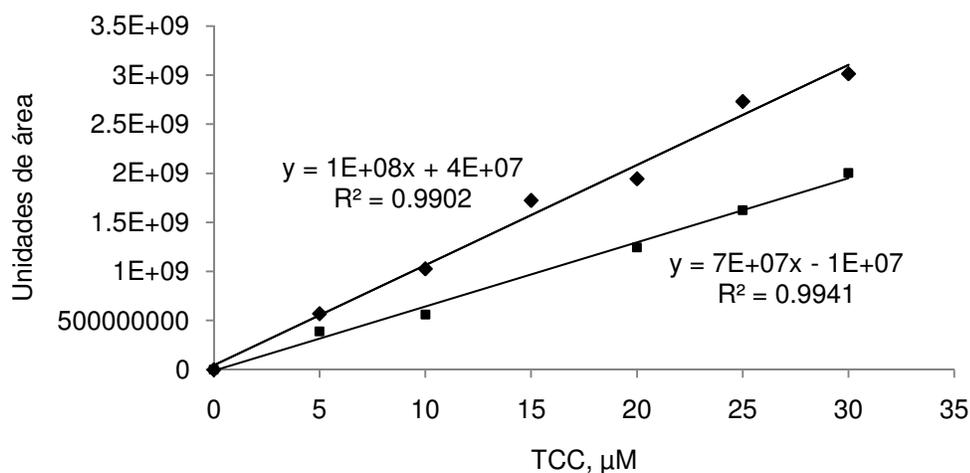


Figura 5.6 Curva de calibración de TCC por cromatografía de gases. ♦, sin SH; ■, con SH inmovilizadas. 1.48 g de resina por botella; 1.2 g SH/L en términos de COT.

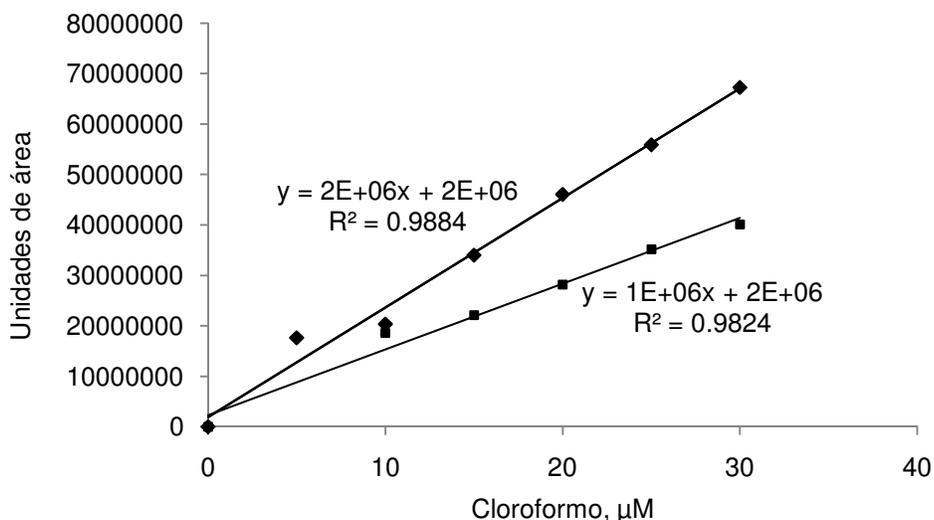


Figura 5.7 Curva de calibración de cloroformo por cromatografía de gases. ♦, sin SH; ■, con SH inmovilizadas. 1.48 g de resina por botella; 1.2 g SH/L en términos de COT.

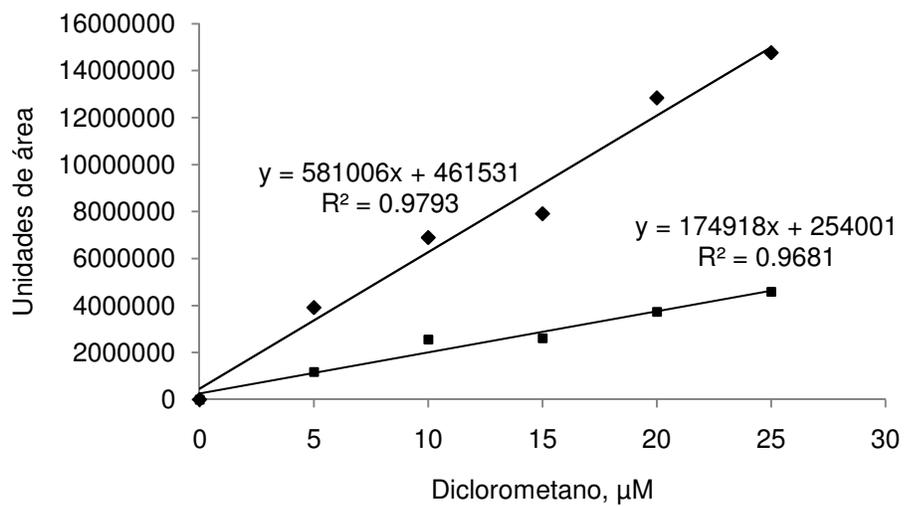


Figura 5.8 Curva de calibración de diclorometano por cromatografía de gases. ♦, sin SH; ■, con SH inmovilizadas. 1.48 g de resina por botella; 1.2 g SH/L. en términos de COT.

6. Resultados

6.1. Inmovilización de las sustancias húmicas

Al inicio del proceso de inmovilización, la solución registró 7520 mg COT/L, mientras que a las 24 horas 7066 mg COT/L. Utilizando la ecuación descrita anteriormente, la cantidad máxima de SH adsorbida sobre la resina (q_{sd}) fue de 24.3 mg SH/g resina. Posteriormente, se realizó la estimación de la desorción y se encontró que ésta no ocurrió, debido a la inexistencia de carbón orgánico disuelto en la muestra final de la solución de desorción. Por lo tanto, la cantidad máxima total de SH adsorbida sobre la resina de intercambio iónico, tomando en cuenta la desorción, fue de 24.3 mg SH/g resina.

6.2. Cinéticas de reducción biológica de sustancias húmicas

6.2.1. Cinéticas de reducción biológica de sustancias húmicas suspendidas

La reducción de sustancias húmicas fue determinada por la técnica de la ferrocina (Burlage *et al.*, 1998), la cual mide la concentración de hierro ferroso. La reducción de Fe(III) a Fe(II) por las SH reducidas requiere la transferencia de un electrón. Así un mili-equivalente de electrones por litro (mEq/L) de Fe(II) equivale a 1 mEq/L de Leonardita reducida, por acción de los consorcios anaerobios. En ninguno de los casos, los controles endógeno, estéril y químico presentaron actividad.

Ambos consorcios lograron reducir las SH de la Leonardita suspendida, prueba de ello es la cuantificación máxima de Fe(II) que se registró al final de las

cinéticas, 156 y 168 horas para los consorcios U y PR, respectivamente. Después de ese momento, la cuantificación de Fe(II) se mantuvo estable y no cambió. Sin embargo, en ambos controles biológicos (consorcio anaerobio sin sustancia húmica) se presentó la producción de Fe(II), lo que indica que ambos consorcios poseen inherentemente material previamente reducido que es capaz de donar electrones al citrato férrico que es utilizado para realizar la cuantificación indirecta de las SH reducidas. Otra posibilidad, es que dichos consorcios contaban ya con una cantidad importante de hierro ferroso. Lo anterior ocurre debido a que, estos consorcios fueron obtenidos de suelos contaminados por hidrocarburos, los cuales comúnmente poseen en su composición compuestos de Fe(III), que también pueden ser reducidos por los microorganismos (O'Loughlin 2008) y, por lo tanto, están siendo cuantificados como Fe(II) soluble, al momento de realizar la técnica de cuantificación utilizada en este estudio.

Debido a lo anterior, fue necesario elaborar gráficas corregidas por el control sin SH, que permitiesen observar con claridad los perfiles de reducción exclusiva de SH suspendidas por la acción biológica. Además, se preparó un control sin consorcio (químico) y un control con consorcio esterilizado (estéril), ambos con SH suspendidas, de los cuales ninguno presentó reducción de SH, por lo que no se presentan en la gráfica.

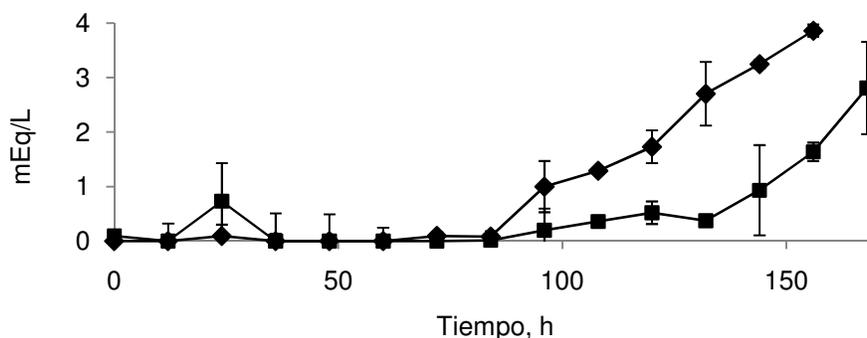


Figura 6.1 Reducción de SH suspendidas por los consorcios anaerobios PR, \blacklozenge ; y U, \blacksquare . Datos corregidos por el control sin SH. Condiciones: sustrato (glucosa) 300 mg/L; SSV: 0.1 g/L; SH: 2 g/L (1.2 g COT/L); medio basal 30 mL; atmósfera 30 mL, N_2/CO_2 (80%/20%). Los resultados presentados son el promedio de incubaciones por duplicado para cada control, las barras de error indican la desviación estándar.

En la Figura 6.1, se puede observar la reducción de SH suspendidas a partir de las 84 horas y durante el resto de las cinéticas en ambos consorcios anaerobios. El consorcio PR fue el que logró reducir 3.7 mEq/L de SH al final de la cinética (156 horas), cantidad mayor a la reducción alcanzada por el consorcio U, 2.8 mEq/L de SH reducidas, al final de la cinética (168 horas). A partir de las 168 horas para PR y 156 horas para U, la reducción de SH no aumentó, por lo que estos tiempos se definieron como los puntos finales de reducción de las SH. De lo anterior, se calcularon las tasas máximas de reducción de SH suspendidas, a partir de la pendiente máxima observada en los perfiles de reducción, que cada consorcio presentó. Las tasas máximas de reducción de SH suspendidas fueron de $247.5 \pm 7.2 \mu\text{Eq/g SSV-h}$ y $167.2 \pm 50.4 \mu\text{Eq/g SSV-h}$, para el consorcio PR y U, respectivamente. De acuerdo a los datos obtenidos, la capacidad aceptora de electrones (CAE) de las SH suspendidas durante estos ensayos, fue de $1,930 \pm 359 \mu\text{Eq/g SH}$ y $1,404 \pm 273 \mu\text{Eq/g SH}$ para los consorcios PR y U, respectivamente. En las Figuras 6.2 y 6.3, se muestran los perfiles de consumo de glucosa y de producción y consumo de AGVs, registrados durante las cinéticas de reducción de SH suspendidas por los consorcios PR y U. Los resultados presentados son el promedio de incubaciones por duplicado para cada control, la desviación estándar fue insignificante por lo que no se presenta. No se muestran los controles endógeno, estéril y químico pues no se detectó consumo de glucosa ni producción de AGVs.

En el control correspondiente a la reducción de las SH, ambos consorcios presentaron una pequeña fase de adaptación durante las primeras horas de la cinética, 24 y 12 horas para PR y U, respectivamente. Tal fase, no se presentó en los controles sin SH; sin embargo, la glucosa fue consumida en su totalidad, en los controles con SH, más rápido que en los controles sin SH. A la par del consumo de glucosa, entre las 36 y 48 horas, se detectó la aparición de dos AGVs durante las cinéticas, acetato y propionato, tanto en controles con y sin SH. La aparición de acetato presentó una tendencia a la acumulación; sin embargo, en el caso de los controles con SH, el acetato presentó una disminución en su concentración alrededor de las 84 y 100 horas, en los consorcios PR y U, respectivamente. Al

final de las cinéticas, el acetato acumulado en los controles sin SH fue mayor que en los controles con SH. Por otro lado, el propionato se presentó justo después de la aparición de acetato, y alcanzó una concentración de casi 5 mEq/L, con una ligera disminución en su concentración hacia el final de las cinéticas, lo que indica que el propionato también fue utilizado como sustrato.

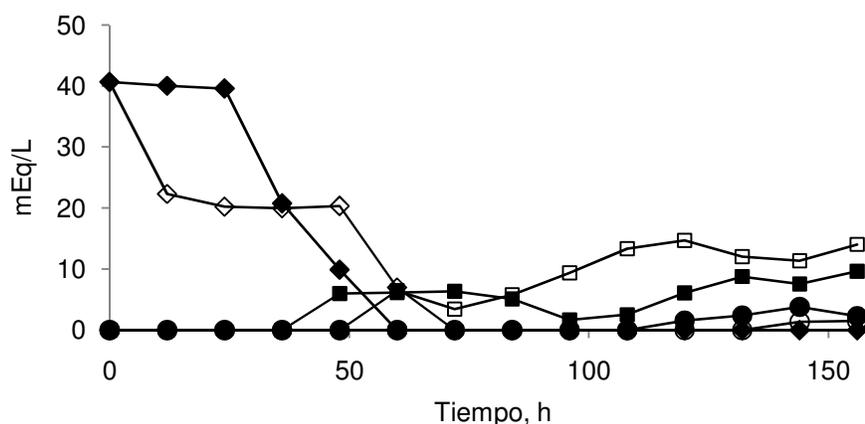


Figura 6.2 Cuantificación de consumo de glucosa, producción y consumo de AGVs por el consorcio PR. ♦, glucosa con SH; ◇, glucosa sin SH; ■, acetato con SH; □, acetato sin SH; ●, propionato con SH; ○, propionato sin SH. Condiciones: sustrato (glucosa) 300 mg/L; SSV: 0.1 g/L; SH: 2 g/L (1.2 g COT/L); medio basal 30 mL; atmósfera 30 mL, N₂/CO₂ (80%/20%).

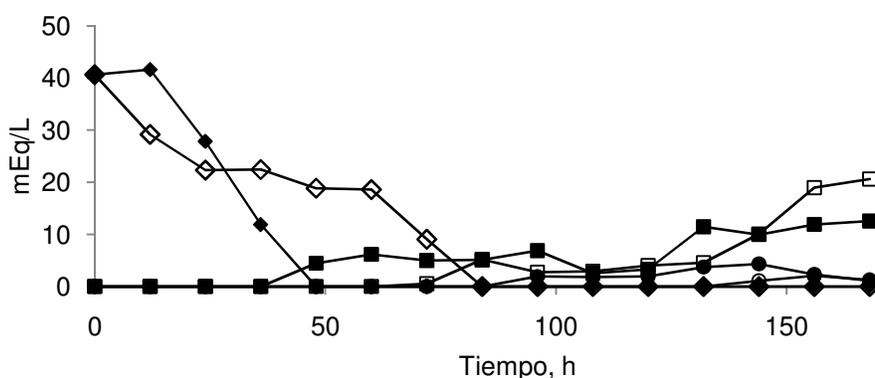


Figura 6.3 Cuantificación de consumo de glucosa, producción y consumo de AGVs por el consorcio U. ♦, glucosa con SH; ◇, glucosa sin SH; ■, acetato con SH; □, acetato sin SH; ●, propionato con SH; ○, propionato sin SH. Condiciones: sustrato (glucosa) 300 mg/L; SSV: 0.1 g/L; SH: 2 g/L (1.2 g COT/L); medio basal 30 mL; atmósfera 30 mL, N₂/CO₂ (80%/20%).

La producción de hidrógeno también fue monitoreada durante las cinéticas de reducción de SH suspendidas (Figura 6.4 y 6.5); los resultados presentados

son el promedio de incubaciones por duplicado para cada control, las barras de error indican la desviación estándar. No se muestran los controles endógeno, estéril y químico pues no se detectó producción de hidrógeno en estas incubaciones. En ambos consorcios, el hidrógeno se acumuló en los controles sin SH, alcanzando una concentración máxima antes de la finalización de las cinéticas. Lo anterior, contrastó con lo observado en los controles con SH, ya que, el hidrógeno, al alcanzar concentraciones de entre 4 y 5 $\mu\text{Eq/L}$, justo antes de las 100 horas, empezó a ser consumido hasta ser agotado en su totalidad. Hecho que se vio reflejado al final de las cinéticas en donde la acumulación fue nula.

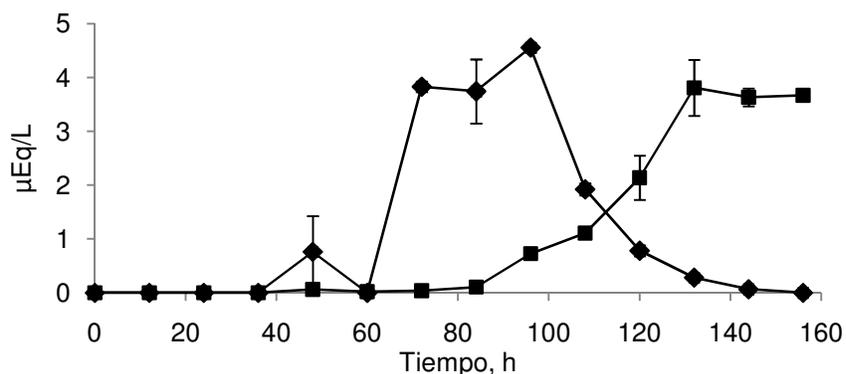


Figura 6.4 Producción de hidrógeno durante la reducción de SH suspendidas por el consorcio PR. ♦: consorcio con SH suspendidas; ■: consorcio sin SH. Condiciones: sustrato (glucosa) 300 mg/L; SSV: 0.1 g/L; SH: 2 g/L (1.2 g COT/L); medio basal 30 mL; atmósfera 30 mL, N_2/CO_2 (80%/20%).

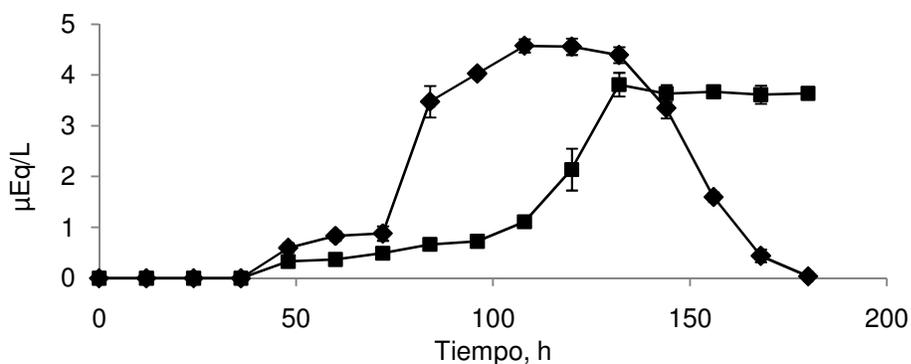


Figura 6.5 Producción de hidrógeno durante la reducción de SH suspendidas por el consorcio U. ♦: consorcio con SH suspendidas; ■: consorcio sin SH. Condiciones: sustrato (glucosa) 300 mg/L; SSV: 0.1 g/L; SH: 2 g/L (1.2 g COT/L); medio basal 30 mL; atmósfera 30 mL, N_2/CO_2 (80%/20%).

En la Tabla 6.1, se muestran los balances de electrones obtenidos al término de las incubaciones de ambos consorcios en ausencia y en presencia de SH suspendidas.

Tabla 6.1 Balances de recuperación en la reducción de SH suspendidas, obtenidos al término de las incubaciones, 156 horas y 168 horas, por los consorcios PR y U, respectivamente.

Presencia de SH suspendidas	Consortio PR, mEq/L		Consortio U, mEq/L	
	No	Si	No	Si
Glucosa consumida	40±0.3	40±0.7	40±1.2	40±0.8
Glucosa	0	0	0	0
Acetato	14.0±0.5	9.6±1	20.6±1.5	12.67±0.6
Propionato	1.5±0.1	2.31±0.3	1.25±0.2	1.07±0.2
Hidrógeno	3.7×10 ⁻³	0	3.6×10 ⁻³	0
SH suspendidas reducidas	-	3.8	-	2.8
% Recuperación general ^a	38	39	54	40
% Recuperación en términos de SH reducidas ^b	-	9.5	-	7

^a% de recuperación general = (Productos identificados)/(glucosa consumida)*100

^b% de recuperación en términos de SH reducidas = (SH reducidas)/(glucosa consumida)*100

En la Tabla 6.1, se observa que ambos consorcios fueron capaces de llevar a cabo la reducción de las SH suspendidas a través de la utilización de la glucosa como sustrato. No obstante, en el consorcio PR se obtuvo una mayor reducción de SH suspendidas al final de la cinética, lo que corresponde a un 9.5% en comparación al 7% obtenido por el consorcio U, en términos de recuperación de SH reducidas, en función de la utilización de la glucosa como sustrato. Además, no se presentó acumulación de hidrógeno al final de las cinéticas, en presencia de SH, mientras que la acumulación fue de 3.6 µEq/L en ausencia de éstas, en ambos consorcios. Además, el porcentaje de recuperación general fue igual en el consorcio PR en ambos controles, mientras que en el consorcio U fue mayor en ausencia de SH.

6.2.2. Cinéticas de reducción biológica de sustancias húmicas immobilizadas

En el caso de las cinéticas de reducción de SH immobilizadas, las concentraciones de SH se manejaron en términos de mg de carbón orgánico total (mg COT), debido a que en esas unidades se determinó la cantidad máxima adsorbida de SH, sobre las resinas de intercambio iónico. Por lo tanto, en estos experimentos la concentración añadida de SH immobilizadas fue de 1.2 g COT/L, lo cual se logró al adicionar 1.5 g de resina con SH immobilizada a cada botella serológica, de acuerdo a la cantidad máxima adsorbida de SH sobre la resina (24.3 mg COT/g resina).

En las Figura 6.6, se muestran los perfiles de reducción de SH immobilizadas, corregidos por el control sin SH para los consorcios PR y U, respectivamente. Los controles químico y estéril no presentaron reducción de SH.

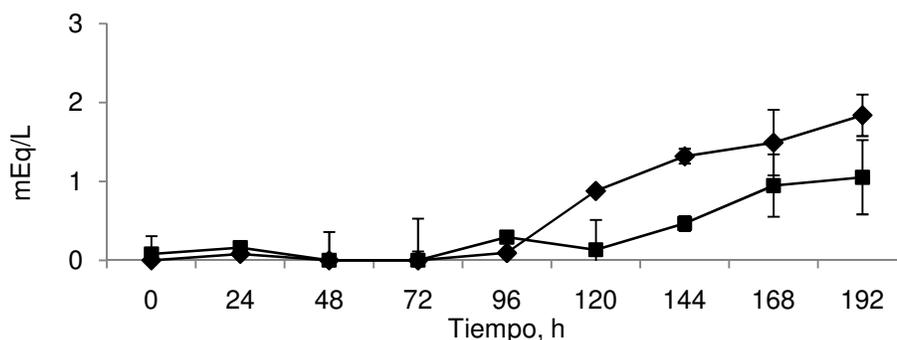


Figura 6.6 Reducción de SH immobilizadas por los consorcios anaerobios PR, ◆; y U, ■. Datos corregidos por el control sin SH. Condiciones: sustrato (glucosa) 300 mg/L; SSV: 0.1 g/L; SH: 2 g/L (1.2 g COT/L); medio basal 30 mL; atmósfera 30 mL, N₂/CO₂ (80%/20%). Los resultados presentados son el promedio de incubaciones por duplicado para cada control, las barras de error indican la desviación estándar.

En la Figura 6.6, se puede observar la reducción de SH, aún estando immobilizadas, a partir de las 100 horas y a lo largo del resto de la cinética, en el consorcio PR. Mientras tanto, la reducción de las SH immobilizadas comenzó a partir de las 145 horas en el consorcio U. El consorcio PR fue el que logró reducir 1.8 mEq/L de SH al final de la cinética (192 horas), cantidad mayor a la reducción alcanzada por el consorcio U, 1.0 mEq/L de SH reducidas, al final de la cinética

(192 horas). A partir de las 192 horas, la reducción de SH inmovilizadas no aumentó, en los consorcios PR y U; por lo que estos tiempos se definieron como los puntos finales de reducción de las SH. De los datos anteriores, se calcularon las tasas máximas de reducción de SH inmovilizadas, a partir de la pendiente máxima observada en los perfiles de reducción, que cada consorcio presentó. Las tasas máximas de reducción de SH inmovilizadas, fueron de $95.7 \pm 5 \mu\text{Eq/g SSV-h}$ y $54.7 \pm 24.5 \mu\text{Eq/g SSV-h}$, para el consorcio PR y U, respectivamente. De acuerdo a los datos obtenidos, la capacidad aceptora de electrones de las SH suspendidas, fue de $1,525 \pm 134 \mu\text{Eq/g SH}$ y $875 \pm 76 \mu\text{Eq/g SH}$ para los consorcios PR y U, respectivamente.

En las Figuras 6.7 y 6.8, se muestran los perfiles de consumo de glucosa y de producción y consumo de AGVs, registrados durante las cinéticas de reducción de SH inmovilizadas, por los consorcios PR y U. Los resultados presentados son el promedio de incubaciones por duplicado para cada control, la desviación estándar fue insignificante por lo que no se presenta. No se muestran los controles endógeno, estéril y químico, pues no se detectó consumo de glucosa ni producción de acetato y propionato.

En el control correspondiente a la reducción de las SH, el consorcio PR presentó una pequeña fase de adaptación durante las primeras 48 horas de incubación, la cual duró el doble de tiempo, en comparación a la reducción de SH suspendidas por el mismo consorcio. Además, tal fase no se presentó en los controles sin SH, como ya se había mencionado. Por otro lado, en el caso del consorcio PR con SH inmovilizada, la glucosa adicionada fue consumida en su totalidad y más rápido que en los controles sin SH. Mientras que, en el caso del consorcio U, en el control con SH suspendidas e inmovilizadas, la glucosa fue consumida en su totalidad a las 72 horas. Alrededor de las 100 horas, apareció el acetato en el consorcio PR; mientras que, acetato y propionato aparecieron justo al momento del consumo total de glucosa en el caso de consorcio U (Figura 6.7 y 6.8). La aparición de acetato, presentó una tendencia a la acumulación, en presencia y ausencia de SH inmovilizadas; sin embargo, en el caso de los

controles con SH inmovilizadas, la acumulación final fue menor. Por otro lado, el propionato sólo se presentó en el consorcio U, en ausencia de SH inmovilizadas.

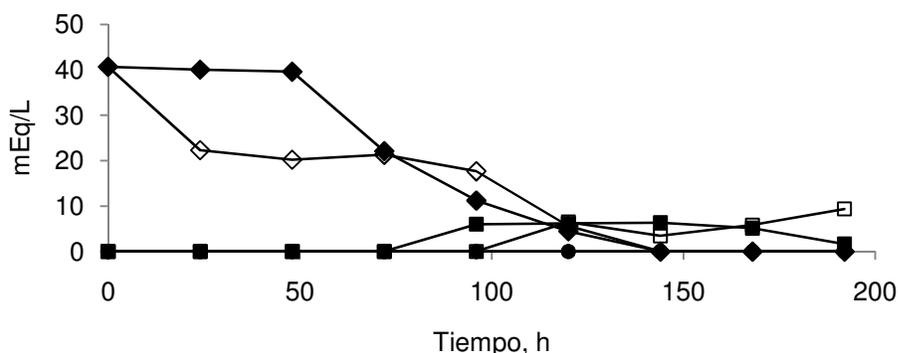


Figura 6.7 Cuantificación de consumo de glucosa, producción y consumo de AGVs por el consorcio PR. ♦, glucosa con SH; ◇, glucosa sin SH; ■, acetato con SH; □, acetato sin SH; ●, propionato con SH; ○, propionato sin SH. Condiciones: sustrato (glucosa) 300 mg/L; SSV: 0.1 g/L; SH: 2 g/L (1.2 g COT/L); medio basal 30 mL; atmósfera 30 mL, N₂/CO₂ (80%/20%).

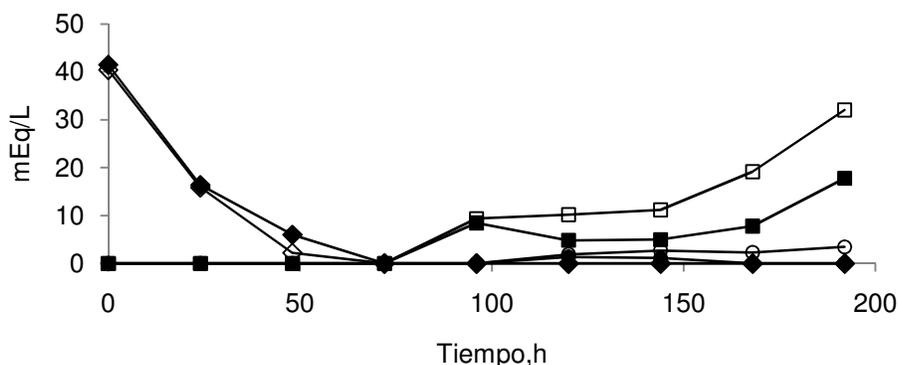


Figura 6.8 Cuantificación de consumo de glucosa, producción y consumo de AGVs por el consorcio U. ♦, glucosa con SH; ◇, glucosa sin SH; ■, acetato con SH; □, acetato sin SH; ●, propionato con SH; ○, propionato sin SH. Condiciones: sustrato (glucosa) 300 mg/L; SSV: 0.1 g/L; SH: 2 g/L (1.2 g COT/L); medio basal 30 mL; atmósfera 30 mL, N₂/CO₂ (80%/20%).

La producción de hidrógeno también fue monitoreada durante las cinéticas de reducción de SH inmovilizadas (Figura 6.9 y 6.10), los resultados presentados son el promedio de incubaciones por duplicado para cada control, las barras de error indican la desviación estándar. No se muestran los controles endógeno, estéril y químico pues no se detectó producción de hidrógeno en estas incubaciones. Al igual que en el caso de las SH suspendidas, en ambos consorcios, el hidrógeno se acumuló en ausencia de SH, hasta llegar a una

concentración de 5 a 8 $\mu\text{Eq/L}$, después de las 192 horas de incubación. Mientras tanto, en presencia de SH inmovilizadas, cuando el hidrógeno alcanzó una acumulación de 3.6 $\mu\text{Eq/L}$, en el consorcio U, comenzó a ser consumido hasta desaparecer por completo alrededor de las 192 horas. Por otro lado, en el consorcio PR, la concentración de hidrógeno acumulada fue de 3.6 $\mu\text{Eq/L}$ a las 192 horas, momento en que se alcanzó la mayor cantidad de SH inmovilizadas reducidas (192 horas).

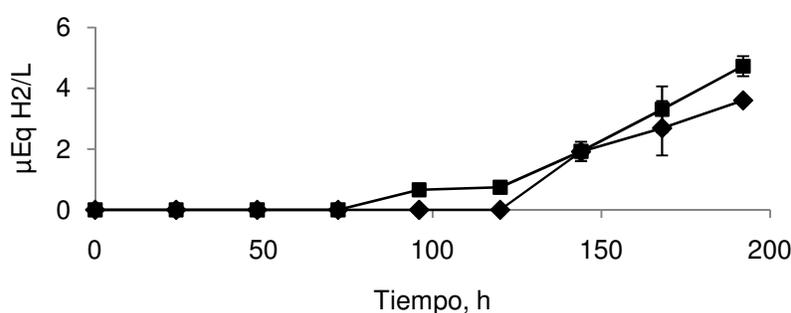


Figura 6.9 Producción de hidrógeno durante la reducción de SH inmovilizadas por el consorcio PR. ♦: consorcio con SH inmovilizadas; ■: consorcio sin SH. Condiciones: sustrato (glucosa) 300 mg/L; SSV: 0.1 g/L; SH: 1.2 g COT/L; medio basal 30 mL; atmósfera 30 mL, N₂/CO₂ (80%/20%).

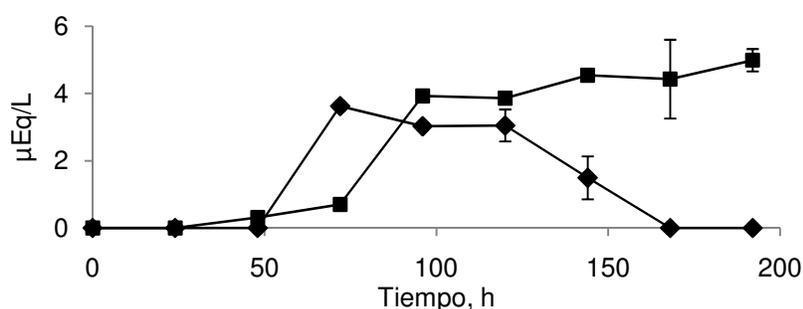


Figura 6.10 Producción de hidrógeno durante la reducción de SH inmovilizadas por el consorcio U. ♦: consorcio con SH inmovilizadas; ■: consorcio sin SH. Condiciones: sustrato (glucosa) 300 mg/L; SSV: 0.1 g/L; SH: 1.2 g COT/L; medio basal 30 mL; atmósfera 30 mL, N₂/CO₂ (80%/20%).

En la Tabla 6.2, se muestran los balances de electrones obtenidos al término de las incubaciones de ambos consorcios, en ausencia y en presencia de SH inmovilizadas.

Tabla 6.2 Balances de recuperación en la reducción de SH inmovilizadas, obtenidos al término de las incubaciones (192 horas), por los consorcios PR y U.

Presencia de SH inmovilizadas	Consortio PR, mEq/L		Consortio U, mEq/L	
	No	Si	No	Si
Glucosa consumida	40±1	40±0.5	40±0.8	40±0.4
Glucosa	0	0	0	0
Acetato	9.4±1	1.65±0.1	32.0±3.6	17.8±2.7
Propionato	0	0	3.45±0.7	0
Hidrógeno	4.7×10 ⁻³	3.6×10 ⁻³	5.0×10 ⁻³	0
SH inmovilizadas reducidas	-	1.83	-	1.05
% Recuperación general ^a	32	9	88	47
% Recuperación en términos de SH reducidas ^b	-	4.6	-	3

^a% de recuperación general = (Productos identificados)/(glucosa consumida)*100

^b% de recuperación en términos de SH reducidas = (SH reducidas)/(glucosa consumida)*100

En la Tabla 6.2, se observa que ambos consorcios fueron capaces de llevar a cabo la reducción de las SH inmovilizadas, ligada a la oxidación de la glucosa. No obstante, el consorcio PR, consiguió una mayor reducción de SH suspendidas al final de la cinética, lo que corresponde a un 4.6% en comparación al 3% obtenido por el consorcio U, en función de la utilización de la glucosa como sustrato. Lo anterior, se vio reflejado en la acumulación de acetato en los controles sin SH suspendida, la cual fue alrededor de 5.7 y 1.7 veces mayor que en presencia de SH para el consorcio PR y U, respectivamente. Además, no se presentó acumulación de hidrógeno al final de las cinética en presencia de SH en el consorcio U, mientras que la acumulación fue de 4.7 y 5.0 $\mu\text{Eq/L}$ en los consorcios PR y U, respectivamente. Así mismo, el porcentaje de recuperación general fue mayor en ausencia de SH, en ambos consorcios.

En la Tabla 6.3, se muestran los datos cinéticos obtenidos durante la reducción de SH suspendidas e inmovilizadas, por ambos consorcios.

Tabla 6.3 Datos cinéticos obtenidos durante la reducción de SH suspendidas e inmovilizadas y su capacidad aceptora de electrones, por los consorcios PR y U

Sustancias húmicas	Consortio PR		Consortio U	
	Suspendida	Inmovilizada	Suspendida	Inmovilizada
Duración de la cinética (horas)	156	192	168	192
Tasa máxima de reducción de SH ($\mu\text{Eq/g SSV-h}$)	247.5±7.2	95.7±5	167.2±50.4	54.7±24.5
Capacidad aceptora de electrones de las sustancias húmicas en términos de COT ($\mu\text{Eq/g SH}$)	3,216±598	1,525±134	2,331±455	875±76

6.3. Reducción química de las sustancias húmicas

Después de haber realizado la reducción química de las SH, por medio de hidrógeno en presencia de paladio, se determinó la capacidad donadora de electrones de éstas, resultando en 5 ± 0.3 mEq/g y 4.7 ± 0.2 mEq/g de SH suspendidas e inmobilizadas, respectivamente.

6.4. Reducción química de tetracloruro de carbono en presencia de sustancias húmicas

Una vez establecida la concentración deseada de TCC ($100\ \mu\text{M}$) para las incubaciones, se procedió a realizar una medición a la hora cero, con el fin de corroborar que la concentración relativa inicial de TCC, fuese igual a la deseada después de alcanzar el equilibrio químico. Posteriormente, se realizaron las mediciones como se indicó en la metodología en la sección 5.6. Durante la cinética de reducción química de TCC, sólo se detectó cloroformo (CF) como producto de deshalogenación. En la Figura 6.11, se muestran los perfiles de desaparición de TCC (normalizado a la concentración inicial) y de aparición de CF, durante la cinética de reducción química, en presencia de SH suspendidas e inmobilizadas (no ocurrió desaparición de TCC en ausencia de SH y no se muestra en la figura).

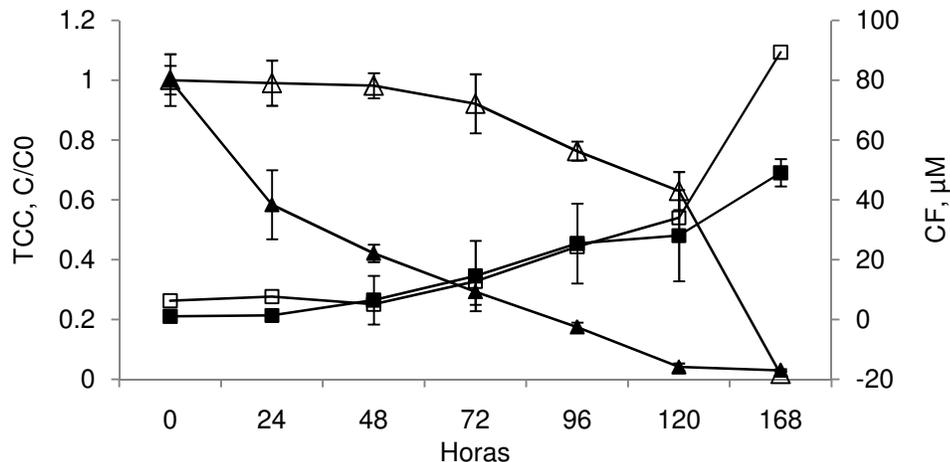


Figura 6.11 Desaparición de TCC (normalizado a la concentración inicial) y aparición de cloroformo, durante la cinética de reducción química. Símbolos: Δ , TCC en presencia de SH suspendidas; \blacktriangle , TCC en presencia de SH inmóviles; \square , CF en presencia de SH suspendidas; \blacksquare , CF en presencia de SH inmóviles. Condiciones: SH: 1.2 g COT/L; medio basal 30 mL; atmósfera 30 mL, N_2/CO_2 (80%/20%). Los resultados presentados son el promedio de incubaciones por duplicado para cada control, las barras de error indican la desviación estándar.

En la Figura 6.11, se puede observar que el TCC desaparece antes en presencia de SH inmóviles, que en presencia de SH suspendidas (120 y 168 horas, respectivamente). Por otro lado, se puede observar que el proceso de reducción del TCC presenta 2 fases en ambos casos, una que va de las 0 a las 72 horas y otra de las 72 a las 168 horas, para el caso de las SH suspendidas. Mientras que para las SH inmóviles, una fase que va de las 0 a las 24 horas y otra de las 24 a las 120 horas. En el caso de las SH suspendidas, la primera fase de reducción de TCC (0 a 72 horas), presenta una tasa de reducción de primer orden (K) igual a $8 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ ($r^2 = 0.8$). Mientras que, en la segunda fase (72 a 168 horas), presenta una K igual a $8.6 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ($r^2 = 0.9$). Mientras que, en presencia de SH inmóviles, durante las primeras 24 horas desapareció el 40 % de la concentración inicial de TCC (91 μM), porcentaje que corresponde al calculado durante la realización de las curvas de calibración de TCC. Lo cual, fue corroborado mediante un control que mostrase la adsorción de TCC sobre la resina de intercambio iónico, durante la duración de la cinética (Figura 6.12).

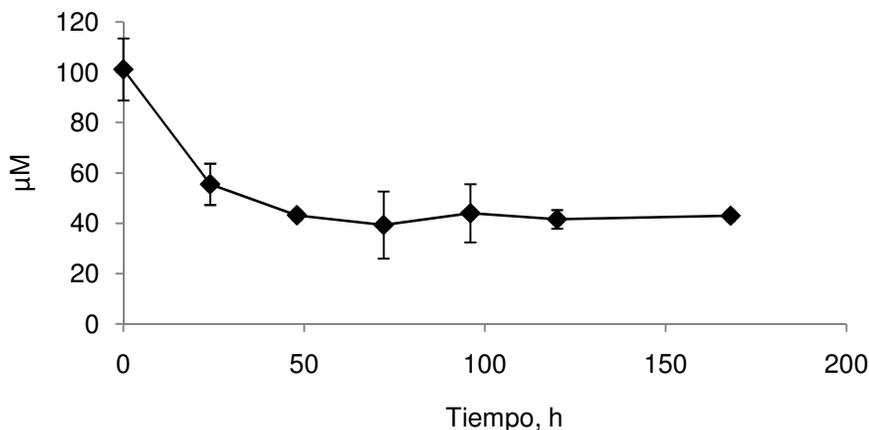


Figura 6.12 Adsorción de TCC en resina de intercambio iónico con SH inmovilizadas (sin reducir). Símbolos: ♦, TCC. Condiciones: SH: 1.2 g COT/L; medio basal 30 mL; atmósfera 30 mL, N₂/CO₂ (80%/20%). Los resultados presentados son el promedio de incubaciones por duplicado para cada control

Se calculó la adsorción específica de TCC sobre la resina empleada como material de soporte para las SH, la cual fue de 0.14 mg TCC/ g resina a las 24 horas, momento en que justamente comenzó la tasa de dehalogenación de TCC con una $K = 5.8 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ($r^2 = 0.9$).

En cuanto a la aparición de CF, éste se detectó desde la hora cero en presencia de SH suspendidas, con una concentración de alrededor de 6 μM, la cual se mantuvo más o menos constante hasta las 48 horas. Justo a las 48 horas, se incrementó la concentración de CF hasta llegar a una concentración final de 89 μM a las 168 horas, lo que correspondió a una recuperación del 90 % en forma de CF a partir de la reducción química de TCC (100 μM iniciales). Además, se detectó una concentración final (a las 168 horas) correspondiente a ión cloruro (Cl⁻), de 3 μM. Por otro lado, en presencia de SH inmovilizadas, el CF se detectó a partir de las 24 horas, lo que indica que las primeras 24 horas correspondieron al proceso de adsorción; y por lo tanto, la concentración relativa de TCC después del proceso de adsorción fue de 53 μM, a partir de la cual, se llevó a cabo el proceso de reducción química. Posteriormente, el CF a las 24 horas, aumentó con una tendencia similar a la ocurrida en presencia de SH suspendidas. No obstante, a partir de las 96 horas, el CF (en presencia de SH inmovilizadas) se acumuló en menor medida, en comparación a lo ocurrido en presencia de SH suspendidas.

Así, a las 120 horas se detectó una concentración final de CF, de 49 μM , en el control con SH inmovilizadas. Esto correspondió a un 97.4% de recuperación de CF, como producto de la reducción de TCC, considerando una concentración inicial, después del proceso de adsorción, de 60 μM . Además, en el caso de las SH inmovilizadas, no se detectó Cl^- remanente.

La determinación del grado de reducción de las SH, al final de la cinética de reducción química de TCC, arrojó valores de $4.7 \text{ mEq/g SH} \pm 0.1$ y $4.5 \pm 0.2 \text{ mEq/g SH}$, para las SH suspendidas e inmovilizadas, respectivamente. Es decir, en el caso de las SH suspendidas 600 $\mu\text{Eq/L}$ fueron utilizados para la reducción de TCC, mientras que en el caso de las SH inmovilizadas, fueron utilizados 400 $\mu\text{Eq/L}$ para reducir el TCC. No obstante, se requiere, teóricamente, dos electrones para llevar a cabo la reducción de 1 mol de TCC a un 1 mol de CF, lo que supone una relación SH:TCC, en términos de micro equivalentes de electrones, de 2:1. Siendo la relación real obtenida a partir de los datos registrados durante la cinética, en términos de equivalente de electrones por gramo de SH, de aproximadamente 6:1, en presencia de SH suspendidas; y 4:1 en presencia de SH inmovilizadas.

En la Tabla 6.4 y 6.5, se muestran los balances de recuperación en términos de CF y cloro, respectivamente. Mientras que, en la Tabla 6.6, se muestra un resumen de los aspectos cinéticos en la reducción química de TCC.

Tabla 6.4 Balances de recuperación en términos de CF, producto de la reducción química de TCC, en presencia de SH suspendidas e inmovilizadas.

	SH suspendidas		SH inmovilizadas	
	Inicial	Final	Inicial	Final
Capacidad donadora de electrones (mEq/L)	5 ± 0.3	4.7 ± 0.1	4.7 ± 0.2	4.5 ± 0.2
TCC (μM)	100 ± 8.6	1.7 ± 0.9	$54^b \pm 10.6$	3.7 ± 2.9
CF (μM)	6 ± 1.6	89 ± 4.9	0^c	49 ± 4.6
% Recuperación ^a en términos de CF	90		97.4	

^a % Recuperación = $(\text{CF final}/\text{TCC consumido}) \times 100$; ^b Valor determinado al finalizar el proceso de adsorción; ^c Por debajo del límite de detección;

Tabla 6.5 Balances de recuperación en términos cloro, producto de la reducción química de TCC, en presencia de SH suspendidas e inmobilizadas.

	SH suspendidas		SH inmobilizadas	
	Inicial	Final	Inicial	Final
TCC ⁻ (μM)	400±34.7	6.8±3.7	216 ^a ±42.4	14.8±0.7
CF ⁻ (μM)	18±4.9	267±14.8	0	147±13.8
Cl ^b (μM)	-	3	-	0
% Recuperación de cloro ^c	69		73	
%Eficiencia de eliminación de TCC ^d	67.5		68	

^a Valor determinado al finalizar el proceso de adsorción; ^b Corregido por el cloro presente en el medio mineral;

^c % Recuperación de cloro = [(Cloro ligado a productos identificados)/Cloro consumido]*100; ^d % Eficiencia de eliminación de TCC = [(Cloro ligado a productos identificados)/TCC inicial]*100

Tabla 6.6 Resumen de los datos cinéticos obtenidos durante en la reducción química de TCC, en presencia de SH suspendidas e inmobilizadas.

Dato	SH suspendidas		SH inmobilizadas
	8x10 ^{-4a}	8.6x10 ^{-3b}	5.8x10 ^{-3c}
K (h ⁻¹)			
Duración cinética (horas)	168		120
Adsorción TCC (μM)	-		38.2 ^d ±6.2
Capacidad donadora de electrones de SH (mEq/g SH-L)	5±0.3		4.7±0.2
Electrones transferidos (μEq/L)	≈600		≈400

^a de las 0 a las 72 horas; ^b de las 72 a las 168 horas; ^c de las 24 a las 120 horas; ^d hasta las 24 horas, 53.5 μM de TCC a partir de ese momento.

6.5. Reducción biológica de tetracloruro de carbono en presencia de sustancias húmicas

La reducción biológica de TCC, se llevó a cabo utilizando el consorcio PR, pues fue el que obtuvo mayores tasas de reducción de SH, tanto suspendidas como inmobilizadas. Además, se preparó un control en ausencia de SH, para determinar la capacidad del consorcio para reducir TCC, sin ser favorecida por la adición de SH. La concentración inicial de TCC en todas las incubaciones biológicas, fue de 50 μM; además, se utilizó una concentración de SH de 0.12 g COT/L.

En términos de la concentración inicial de TCC (50 μM), en ausencia de SH, se encontró que sólo se obtuvo el 19% de recuperación, en términos del CF detectado al final de la incubación. Lo que indica que únicamente se produjeron 9 μM de CF a partir de los 50±9 μM iniciales de TCC. Por otro lado, el perfil de

reducción de TCC, en presencia de SH suspendidas, mostró una tendencia similar a la presentada en el control sin adición de SH (control biológico). De la cantidad inicial de TCC ($50 \pm 3.4 \mu\text{M}$), únicamente se detectó la aparición de 4.2 y $0.47 \mu\text{M}$ de CF y diclorometano (DM), respectivamente. Se cuantificaron $46 \pm 6.4 \mu\text{M}$ de TCC al final de la cinética (79 horas), en presencia de SH suspendidas, incluso más en comparación al control sin SH ($43 \mu\text{M}$). Por otro lado, se detectó DM en presencia de SH suspendidas (Figura 6.13, en el control estéril no se detectó desaparición de TCC, y no se presenta en la figura). Además, La concentración final de glucosa en ausencia y presencia de SH suspendidas, fue de 35 mEq/L, lo cual indica que ésta no fue aprovechada en su totalidad por el consorcio PR, como había sucedido en los experimentos de reducción biológica de SH (Tabla 6.1 y 6.2).

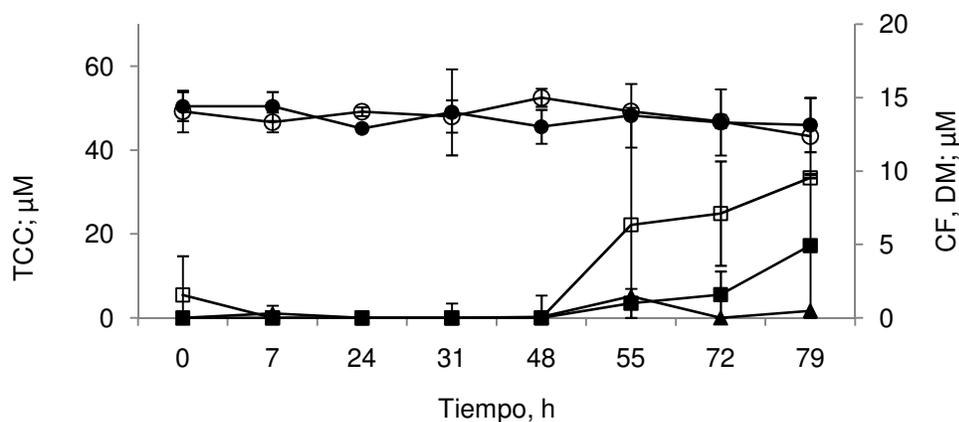


Figura 6.13 Desaparición de TCC y aparición de cloroformo en cinética de reducción biológica de TCC en presencia de SH suspendidas. Símbolos: ○, TCC en ausencia de SH; ●, TCC en presencia de suspendidas; □, CF en ausencia de SH; ■, CF en presencia de SH suspendidas; ▲, DM en presencia de SH suspendidas. Condiciones: sustrato (glucosa) 300 mg/L; SSV: 0.1 g/L de consorcio anaerobio PR; SH: 0.12 g COT /L; $50 \mu\text{M}$ TCC; medio basal 30 mL; atmósfera 30 mL, N_2/CO_2 (80%/20%). Los resultados presentados son el promedio de incubaciones por duplicado para cada control, las barras de error indican la desviación estándar.

Por otro lado, en presencia de SH inmovilizadas, la reducción biológica de TCC fue completa. Se puede ver en la Figura 6.14 la presencia de tres fases, en la incubación realizadas con SH inmovilizadas. Una primera fase durante las primeras 6 horas, las cuales corresponden a la adsorción de TCC sobre la resina de intercambio iónico (18% de la concentración inicial, adsorción específica igual a 0.28 mg TCC/g resina a las 24 horas), hecho que se comprobó en el control estéril

en presencia de SH inmovilizadas (Figura 6.14), en donde se presenta misma fase. Posteriormente, a partir de la hora 6 y hasta las 24 horas, se observó una fase de adaptación del consorcio PR, en la que no ocurre cambio en la concentración de TCC, ni aparición de productos. Finalmente, una tercera fase a partir de las 24 horas, en donde dio inicio la reducción de TCC, lográndose su reducción total hasta las 79 horas. La constante K de la tasa de reducción biológica de TCC, en presencia de SH inmovilizadas, dio un valor de $1.5 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ ($r^2 = 0.98$), velocidad que es casi 14 veces mayor a la presentada por el control con SH suspendidas, de $1.1 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ($r^2 = 0.9$). En cuanto a la producción de CF, éste apareció en presencia de SH inmovilizadas, justo después del proceso de adaptación, lo que indica que en ese momento (24 horas), fue cuando dio inicio la reducción biológica de TCC. El CF se acumuló hasta llegar a una concentración de $30 \pm 5 \text{ } \mu\text{M}$, mientras que el DM se acumuló hasta un valor de $0.1 \text{ } \mu\text{M}$, y sólo apareció en una de las dos botellas serológicas correspondientes al duplicado de la incubación. Además, la glucosa no fue detectada al final de la cinética, mientras que el acetato tuvo una acumulación de 21.8 mEq/L , en presencia de SH inmovilizadas. El porcentaje de recuperación en términos de CF y DM, fue de 75 %, en relación a la concentración inicial de TCC ($40.7 \text{ } \mu\text{M}$) después de la adsorción. No se detectó Cl^- en las cinéticas de reducción biológica de TCC.

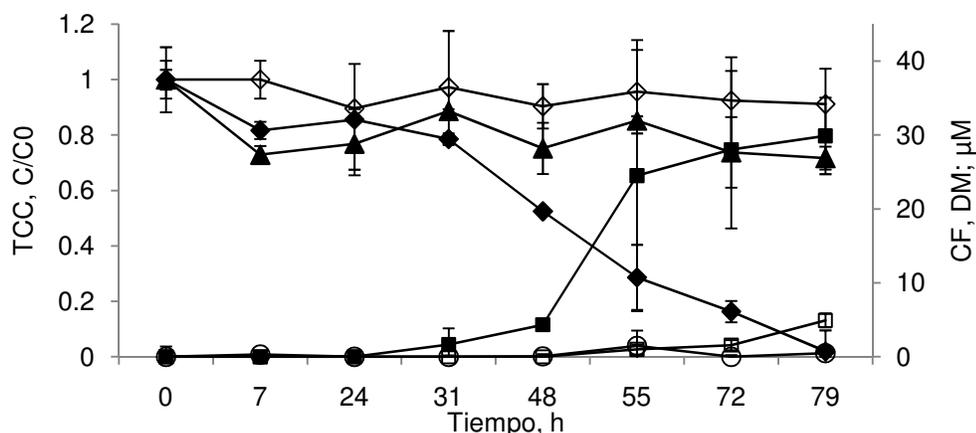


Figura 6.14 Desaparición de TCC y aparición de CF y DM en cinética de reducción biológica de TCC, normalizada a la concentración inicial de TCC, en presencia de SH suspendidas. Símbolos: \diamond , TCC en presencia de SH suspendidas; \blacklozenge , TCC en presencia de SH inmovilizadas; \square , CF, en presencia de SH suspendidas; \blacksquare , CF, en presencia de SH inmovilizadas; \circ , DM en presencia de SH suspendidas; \blacktriangle , TCC control estéril. Condiciones: sustrato (glucosa) 300 mg/L; SSV: 0.1 g/L de consorcio anaerobio PR; SH: 0.12 g COT/L; 50 μM TCC; medio basal 30 mL; atmósfera 30 mL, N_2/CO_2 (80%/20%). Los resultados presentados son el promedio de incubaciones por duplicado para cada control, las barras de error representan la desviación estándar.

En la Tabla 6.7 y 6.8, se muestran los balances de recuperación en términos de CF y cloro, respectivamente. Mientras que, en la Tabla 6.9, se muestra un resumen de los aspectos cinéticos. En la reducción biológica de TCC.

Tabla 6.7 Balances de recuperación en términos de CF y DM, producto de la reducción biológica de TCC, en presencia de SH suspendidas e inmovilizadas.

	SH suspendidas		SH inmovilizadas	
	Inicial	Final	Inicial	Final
Glucosa (mEq/L)	40	35.5	40	0
Acetato (mEq/L)	-	0	-	21.8
TCC (μM)	50.4 ± 3.4	46 ± 6.4	$40.7^b \pm 9.6$	0.9 ± 0.05
CF (μM)	0^c	4.9 ± 0.9	0^c	30 ± 5.2
DM (μM)	-	0.47 ± 0.5	-	0^c
% Recuperación ^a en términos de CF y DM	122		75	

^a % Recuperación = $(\text{CF} + \text{DM final} / \text{TCC consumido}) * 100$; ^b Valor determinado al finalizar el proceso de adsorción; ^c Por debajo del límite de detección;

Tabla 6.8 Balances de recuperación en términos cloro, producto de la reducción biológica de TCC, en presencia de SH suspendidas e inmovilizadas.

	SH suspendidas		SH inmovilizadas	
	Inicial	Final	Inicial	Final
TCC ⁻ (μM)	200±13.6	184±25.6	163 ^a ±38.4	3.6±0.2
CF ⁻ (μM)	0	14.7±2.8	0	90±15.6
DM (μM)	-	0.94±1	-	0 ^c
Cl ^b (μM)	-	0	-	0
% Recuperación de cloro ^c	97.7		56.5	
%Eficiencia de eliminación de TCC ^d	8		55	

^a Valor determinado al finalizar el proceso de adsorción; ^b Corregido por el cloro presente en el medio mineral; ^c % Recuperación de cloro = [(Cloro ligado a productos identificados)/TCC consumido]*100; ^d % Eficiencia^d de eliminación de TCC = [(Cloro ligado a productos identificados)/TCC inicial]*100

Tabla 6.9 Resumen de datos cinéticos en la reducción biológica de TCC, en presencia de SH suspendidas e inmovilizadas

Dato	SH suspendidas	SH inmovilizadas
K (h ⁻¹)	1.1x10 ⁻³	1.5x10 ^{-2a}
Duración cinética (horas)	79	79
Adsorción TCC (μM)	-	8.7 ^c ±1.3

^a Calculado a partir de las 48 horas.; ^c Hasta las 40 horas.

7. Discusión

El objetivo de este estudio fue evaluar los aspectos cinéticos involucrados durante la bio-transformación reductiva de TCC por consorcios anaerobios, en presencia de SH suspendidas e inmovilizadas. Lo anterior, fue planteado para determinar la etapa limitante de dicho proceso, lo que permitirá optimizar procesos biológicos de deshalogenación reductiva, en presencia de SH, en aguas contaminadas por TCC.

Se han realizado investigaciones, las cuales señalan que diferentes mediadores redox con propiedades catalíticas (ácidos húmicos, quinonas, vitaminas), han aumentado la tasa de reducción de TCC, como se ilustra en la Figura 2.3 (Workman *et al*, 1997; Collins & Picardal, 1999; Cervantes *et al.*, 2004). No obstante, hasta ahora no se han realizado estudios en los que se haya determinado la etapa limitante del proceso. Además, tampoco se ha explorado la capacidad de mediadores redox inmovilizados, para llevar a cabo tal proceso. Lo que puede resultar sumamente benéfico al momento de implementar un proceso de este tipo de forma continua.

Por lo tanto, para promover la utilización de mediadores redox en procesos de deshalogenación reductiva de TCC, es necesario explorar los aspectos cinéticos que ocurren en presencia de mediadores redox, tanto de forma suspendida (o soluble) como de forma inmovilizada, con el fin de mantener sus propiedades catalíticas en procesos en continuo. Así, los mediadores redox una vez inmovilizados, permitiría la utilización de la capacidad que poseen, para oxidarse y reducirse de manera cíclica, en procesos en continuo, (García, 2008); y por otro lado, la identificación de la etapa limitante permitiría la optimización del proceso.

7.1. Cinéticas de reducción biológica de sustancias húmicas, primera etapa

En los resultados obtenidos durante las cinéticas de reducción de SH suspendidas (Figura 6.1), la tasa máxima de reducción fue la lograda por el consorcio PR ($247.5 \pm 7.24 \mu\text{Eq/g SSV-h}$). Además, la cinética de reducción de SH inmovilizadas (Figura 6.6), indicó también que el consorcio PR, fue el que obtuvo la tasa máxima de reducción de SH inmovilizadas ($95.7 \pm 5 \mu\text{Eq/g SSV-L}$). Lo anterior, se vio reflejado en los porcentajes de recuperación de SH reducidas a partir de la glucosa consumida (Tablas 6.1 y 6.2). Esto pudo depender de varios factores, como el tipo de microorganismos presentes en el consorcio; es decir, la cantidad de SSV que corresponden a bacterias con capacidad de reducir las SH. Por otro lado, la afinidad que presenta cada tipo de microorganismo para reducir cierto tipo de SH, dependiendo del contenido de quinonas, puede estar contribuyendo al aumento o disminución de la tasa máxima de reducción de SH (Rau *et al*, 2002). Por ejemplo se concluyó que *Escherichia coli* y *Sphingomona xenophaga*, poseen diferentes capacidades para reducir las quinonas lawsona y AQS. Tales diferencias, pueden depender de los sistemas enzimáticos específicos de cada microorganismo para reducir SH, además de que la actividad de dichos sistemas enzimáticos puede estar condicionada por el tipo de sustrato (Rau *et al.*, 2002).

Por otra parte, la tasa de reducción de las SH siempre fue menor cuando éstas se encontraban inmovilizadas sobre la resina de intercambio iónico en todos los casos. Lo anterior, puede ser debido a que las SH al estar suspendidas, se dispersan homogéneamente en todo el volumen de trabajo, lo cual permite, gracias a la agitación constante, que estén en íntimo contacto con el consorcio, también suspendido, en el medio mineral. Por otro lado, las SH inmovilizadas, al estar adsorbidas sobre la superficie de las resinas de intercambio iónico, estuvieron concentradas únicamente sobre la estructura de la resina, lo que pudo haber impedido contacto suficiente entre las SH y el consorcio. De lo contrario, se hubiera conseguido una mejor tasa de reducción de las SH, en este último caso.

También, es probable que, si las SH formaron multi-capas durante su inmovilización sobre la resina de intercambio iónico, los grupos de interés de las SH (quinonas), quedaron inaccesibles para ser reducidos por los consorcios, debido al impedimento estérico, resultado de la compleja estructura de las SH. Lo que pudo haber resultado en una tasa de reducción menor, en comparación a la obtenida en presencia de SH suspendidas.

De acuerdo a las tasas de reducción, se obtuvo la CAE que las SH presentaron durante su reducción. La mayor CAE registrada fue en presencia del consorcio PR la cual correspondió a 3,216 g y 2,331 $\mu\text{Eq/g}$ COT de SH a las 156 y 168 horas de incubación, en presencia de SH suspendidas e inmovilizadas, respectivamente. Tales valores son mayores a los obtenidos en un estudio, en donde se llevó a cabo la reducción de ácidos húmicos por bacterias fermentativas (191 $\mu\text{Eq/g}$ de ácidos húmicos) a las 50 horas de incubación (Benz *et al*, 1998). En otro estudio realizado, en donde se evaluó la capacidad de materia orgánica natural para reducir Fe(II), se obtuvo una CAE de 530 $\mu\text{Eq/g}$ de ácidos húmicos en presencia de *Shewanella putrefaciens* CN32, durante sólo 2 horas de incubación (Chen *et al.*, 2003). No obstante, *S. putrefaciens* CN 32 es una bacteria especializada en llevar a cabo reducciones desasimilativas de minerales, lo que le permite reducir fácilmente fracciones de la materia orgánica como los ácidos húmicos. Hecho que no necesariamente aplica para los consorcios utilizados en este estudio, pues los tipos específicos de bacteria que conforman su composición se desconoce.

7.1.1. Consumo de sustrato durante la cinética de reducción biológica de sustancias húmicas

En cuanto al consumo de glucosa, es evidente que ésta fue consumida en su totalidad por ambos consorcios, durante la reducción de SH suspendidas e

inmovilizadas (Figuras 6.2, 6.3, 6.7a y 6.8). También, se detectó producción de acetato en todos los casos, lo cual ya ha sido reportado en sistemas anaerobios bajo condiciones reductoras de minerales de Fe(III) (Lovley *et al.*, 1986); por otro lado, se detectó propionato en presencia de SH suspendidas, mientras que en presencia de SH inmovilizadas no fue detectado. Lo anterior indicó que la glucosa, mediante fermentación, fue transformada a acetato por acción de microorganismos presentes en ambos consorcios, los cuales llevaron a cabo tanto la acidogénesis como la acetogénesis. No obstante, en presencia de SH suspendidas, el acetato comenzó a desaparecer a las 72 y 96 horas, en el consorcio PR y U, respectivamente. Mientras que, en presencia de SH inmovilizadas, el acetato empezó a desaparecer a las 144 y 96 horas, en el consorcio PR y U, respectivamente. El inicio de consumo de acetato ocurrió alrededor del mismo tiempo en comenzó la pendiente máxima de reducción de SH, en cada uno de los casos (Figuras 6.1 y 6.6). A las 84 horas en ambos consorcios en presencia de SH suspendidas, y a las 100 horas en presencia de ambos consorcios en presencia de SH inmovilizadas. Esto, señala que el acetato fue utilizado por los consorcios como donador directo de electrones, para llevar a cabo la reducción de SH. En estudios previos se ha demostrado que el acetato es utilizado como donador de electrones para llevar a cabo la bio-reducción de quinonas modelos (Cervantes *et al.*, 2000).

Además, se ha señalado que en presencia de SH, bacterias reductoras de hierro, tienden a generar más acetato a partir de la fermentación de glucosa, que en ausencia de SH (Benz *et al.*, 1998). Este hecho contrasta con lo obtenido en el presente estudio, pues la acumulación de acetato en presencia de SH fue menor que en ausencia de éstas; sin embargo, la disminución de acetato únicamente en los controles con SH, indica que este fue utilizado como donador de electrones. Por otro lado, en presencia de SH suspendidas e inmovilizadas, fue en el consorcio PR en donde se acumuló en menor cantidad el acetato al final de la cinéticas, en comparación con el consorcio U. Esto señala que el consorcio PR utiliza más fácilmente el acetato producido que el consorcio U, y que por lo tanto, a partir del consumo de acetato como sustrato, el consorcio PR logró la mayor tasa

de reducción de SH suspendidas (Figuras 6.1 y 6.6). Lo que es un hecho, es que a partir de la fermentación de la glucosa, por microorganismos capaces de sustentar su actividad metabólica, mediante este proceso, fue posible la generación de acetato, el cual fue utilizado por otro tipo de microorganismos capaces de reducir a las SH presentes en el consorcio, y así mantener su actividad metabólica. Además, en ausencia de SH se excedió la relación teórica de glucosa/acetato (1:3), lo que indica la posible presencia de algún sustrato, presente de manera natural en la composición de los consorcios evaluados; además, de la glucosa adicionada en los experimentos.

Se ha determinado el hecho de que un microorganismo, el cual puede llevar a cabo la fermentación de glucosa en presencia de Fe(III) como aceptor de electrones, puede obtener un rendimiento energético por la transferencia de electrones, incluso mayor del que se obtiene por la oxidación de la glucosa. Lo que hace factible que la glucosa sea fermentada en sistemas sulfato reductores o en presencia de minerales de Fe(III), en vez de ser oxidada (McInerney & Beaty 1988). Hecho que puede ser aplicado a las condiciones de los experimentos llevados a cabo en este estudio, en donde las SH fue el de aceptor de electrones, lo que el Fe(III) generalmente realiza. Lo que además, es más factible si se toma en cuenta que el acarreo de electrones para reducir SH, sustenta la actividad metabólica de microorganismo reductores de Fe(III), el cual incluso es reducido gracias a SH reducidas biológicamente, en muchos ambientes naturales (Lovley *et al.*, 1996; Coates *et al.*, 1998). Existen diversas rutas metabólicas para la fermentación de glucosa, de las cuales, dependiendo de las condiciones, se obtienen distintos rendimientos energéticos. La ruta metabólica, la cual arroja uno de los mayores rendimientos energéticos a partir de la fermentación de la glucosa, es la que se presentó en los experimentos realizados en este estudio, de acuerdo a los productos identificados como se muestra en la Tabla 7.1, reacción 3 (Lovley & Phillips, 1989).

Tabla 7.1 Rutas metabólica en la fermentación de la glucosa y sus energías libres potencialmente disponibles.

Reacción	Reactivos	Productos	$\Delta G'$ (KJ/electrón transferido (Estándar) ^a)
1	$C_6H_{12}O_6 + 24Fe(OH)_3(s) + 42H^+$	$24Fe^{2+} + 6HCO_3^- + 60H_2O$	-12
2	$C_6H_{12}O_6 + 8Fe(OH)_3(s) + 12H^+$	$8Fe^{2+} + 2CH_3COO^- + 2HCO_3^- + 20H_2O$	-37
3	$C_6H_{12}O_6 + H_2O$	$CH_3COO^- + CH_3CH_2COO^- + HCO_3^- + H_2 + 3H^+$	-71
4	$C_6H_{12}O_6 + 2Fe(OH)_3(s) + H^+$	$2Fe^{2+} + CH_3COO^- + CH_3CH_2COO^- + HCO_3^- + 5H_2O$	-76
5	$C_6H_{12}O_6 + 2.6H_2O$	$0.6CH_3COO^- + 0.7CH_3CH_2CH_2COO^- + 2HCO_3^- + 2.6H_2 + 3.3H^+$	-60
6	$C_6H_{12}O_6$	$OOCCH_2CH_2COO_2^- + CH_3COO^- + H_2 + 3H^+$	-66
7	$C_6H_{12}O_6$	$2CH_3CHOHCOO^- + 2H^+$	-50
8	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O$	$2CH_3CH_2OH + 2HCO_3^- + 2H^+$	-57

^a Los cambios de energía libre a pH 7 ($\Delta G'$) fueron calculados por las energías libres estándares de la formación de productos y reactivos. La reacciones 3 y 5 a 8 son de (McInerney & Beaty, 1988).

La reacción 3 presentada en la Tabla 7.1, justifica también la aparición de hidrógeno, producto de la fermentación de la glucosa adicionada como sustrato. El cual fue detectado en presencia y en ausencia de SH, durante las incubaciones. No obstante, sólo se acumuló en ausencia de SH, mientras que en presencia de éstas desapareció en todos los casos alrededor de las 100 horas, excepto en presencia de SH inmovilizadas, por el consorcio PR (Figuras 6.4, 6.5, 6.9 y 6.10). Esto indicó, que además del acetato, el hidrógeno producido a partir de la fermentación de la glucosa, fue utilizado como donador de electrones para llevar a cabo la reducción de las SH presentes en los experimentos, lo cual no es un hecho particular, pues ya ha sido reportado el uso de hidrógeno como donador de electrones en la reducción de SH (Coates *et al.*, 1996; Cervantes *et al.*, 2000; Francis *et al.*, 2000).

7.2. Reducción química de tetracloruro de carbono en presencia de sustancias húmicas, segunda etapa

Durante la reducción química de TCC, en presencia de SH suspendidas (Figura 6.11) se presentaron dos K distintas. Una K1 que fue de $8 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ entre las 0 y 72 horas; y una K2 de $8.6 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ entre las 72 y 168 horas. Esto indica que, la transferencia de electrones de las SH reducidas hacia el TCC, durante el transcurso de la cinética, no se mantuvo constante. La K1 es 10.7 veces menor que K2, lo que señala que durante K1 el flujo de electrones hacia el TCC fue menor que durante el periodo de tiempo en el que se obtuvo K2. Lo anterior, puede deberse a la cantidad de radicales quinona presentes durante la aparición de las dos K, en la reducción química de TCC. Existe evidencia experimental que sugiere, que la concentración de radicales semi-quinona (parcialmente protonadas), generados durante los procesos de deshalogenación reductiva, pueden controlar las tasas de conversión de los compuestos orgánicos (Scott *et al.*, 1998; Rau *et al.*, 2002). En el presente estudio, la reducción química de las SH suspendidas, mediante hidrógeno, pudo haber generado quinonas completamente protonadas (hidroquinonas). Así, la reducción de TCC durante las primeras 72 horas de incubación, pudo haber sido llevada a cabo principalmente a partir de quinonas completamente protonadas. Estas hidroquinonas presentes en las SH, al transferir electrones al TCC, generaron radicales semi-quinonas, los cuales poseen capacidades de reducción más altas que las hidroquinonas (Curtis & Reinhard, 1994). Por lo que, a partir de las 72 horas, estas semi-quinonas pudieron haber contribuido al incremento de la K. Además, se ha comprobado, que otro tipo de quinonas (mercaptoquinonas), favorecen mayores tasas de reducción de TCC, en comparación a semi-quinonas e hidroquinonas (Doong & Chiang, 2005). Lo anterior debido, a la incorporación de hidrosulfuro a la estructura de quinonas, mediante reacciones de adición electrofílica (Perlinger *et al.*, 1996). Esto pudo ocurrir durante las incubaciones en presencia de SH suspendidas, debido a los grupos sulfonato presentes en las SH, y a la presencia de Na_2S en el medio mineral, los cuales pudieron haber sido reducidos por el hidrógeno utilizado como

donador de electrones, en la reducción química de las las SH. Así, el hidrosulfuro producido, dio pie a la formación de mercapto-quinonas durante la reducción de TCC, lo que se vio reflejado en el incremento de K a las 72 horas. Por otro lado, el contenido de semi-quinonas en las SH está directamente relacionado con la capacidad que las SH poseen para transferir electrones (Scott *et al.*, 1998), mientras que, otras investigaciones han revelado que la cantidad de hidroquinonas sin protonar y radicales semi-quinona, están relacionados con la eficiencia de eliminación de contaminantes prioritarios, en presencia de mediadores redox como AQDS y ácidos húmicos, bajo condiciones reductoras (Curtis & Reinhard., 1994; Scott *et al.*, 1998).

En el caso de la reducción química de TCC en presencia de SH inmovilizadas (Figura 6.11), durante las primeras 24 horas se llevó a cabo la adsorción de TCC sobre la resina de intercambio iónico, utilizada como material de soporte para las SH. Hecho que fue comprobado, mediante un control el cual consistió de SH inmovilizadas oxidadas, en dónde el TCC no pudo haber sufrido un proceso de reducción por acción de las SH; no obstante, se observó la desaparición del 40% de la concentración inicial de TCC (100 μM) durante las primeras 24 horas (Figura 6.12). Lo anterior, se atribuyó exclusivamente al proceso de adsorción. La K registrada durante la reducción química de TCC en presencia de SH inmovilizadas a partir de las 24 horas de incubación (después del proceso de adsorción) fue de $5.8 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$. Se puede observar que la K2 obtenida en presencia de SH suspendidas fue 32% mayor que la K obtenida en presencia de SH inmovilizadas, en la reducción química de TCC. Esto pudo deberse a las limitaciones de transferencia de masa, producto de la inmovilización de las SH sobre la resina de intercambio iónico, lo que hizo que las SH inmovilizadas permanecieran en fase sólida, a diferencia de las SH suspendidas, las cuales, gracias al proceso de sulfonación, pudieron ser solubilizadas en el medio mineral.

Además, como ya se mencionó, existe evidencia experimental que sugiere que la concentración de radicales semi-quinona e hidroquinona, presentes en procesos de deshalogenación reductiva, pueden controlar las tasas de conversión

de los compuestos orgánicos (Scott *et al.*, 1998; Rau *et al.*, 2002). Lo anterior, es válido para sistemas en los que los mediadores redox se han estudiado de forma soluble o suspendida; sin embargo, en el caso del presente estudio, el efecto de la inmovilización de las SH sobre la resina de intercambio iónico podría estar modificando la forma en que estos radicales semi-quinona e hidroquinona son formados, debido a la inmovilización *per se*. La inmovilización de las SH sobre la resina de intercambio iónico, pudo tener un impacto en la cantidad de quinonas reducidas, debido a la posible formación de multi-capas durante el proceso de inmovilización. Es probable que parte de los grupos redox activos, presentes en las SH, quedaran “atrapados” debido al impedimento estérico, producto de la inmovilización. Lo que ocasionó una CAE menor en las SH inmovilizadas (4.7 mEq/g SH), en comparación a las suspendidas (5 mEq/g SH), y que dio pie a una K menor en presencia de SH inmovilizadas que suspendidas.

Por otro lado, el único compuesto detectado, producto de la reducción química de TCC, fue el CF. Por lo que la ruta de deshalogenación más probable, ocurrida durante el proceso de reducción química, fue la presentada en la Figura 7.1, la cual ya ha sido propuesta anteriormente (Cervantes *et al.*, 2004).

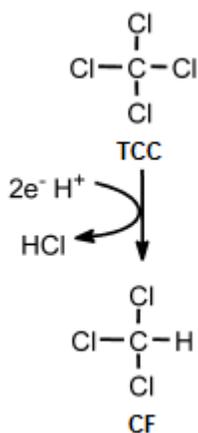


Figura 7.1 Formación de CF propuesta para la cinética de reducción química de TCC.

Además, se detectó Cl^- , sólo en presencia de SH suspendidas, a una concentración de $3 \mu\text{M}$ al final de la cinética de reducción química de TCC. No obstante, existió un excedente en la cantidad de micro-equivalentes de electrones

utilizados para llevar a cabo la reducción química de TCC, puesto que, la capacidad donadora de electrones (CDE) inicial fue de 5 y 4.7 mEq/g, para las SH suspendidas e inmovilizadas, respectivamente. Mientras que, al final de las cinéticas, dicha CDE fue de 4.7 mEq/g para las SH suspendidas y 4.5 mEq/g para las SH inmovilizadas, lo que indica que se utilizaron alrededor de 600 $\mu\text{Eq/L}$ y 400 $\mu\text{Eq/L}$, en cada uno de los casos, para reducir el TCC en su totalidad. De acuerdo a la Figura 7.1, únicamente deberían ser necesarios 200 $\mu\text{Eq/L}$ para llevar a cabo la deshalogenación de 100 μM de TCC a CF, mientras que harían falta alrededor de 108 $\mu\text{Eq/L}$ para llevar a cabo la deshalogenación de TCC, en presencia de SH inmovilizadas, después del proceso de adsorción. Lo anterior podría deberse a la aparición de algún intermediario, durante la reducción de TCC, el cual pudo haber demandado una cantidad de electrones mayor a la necesaria; sin embargo, durante el análisis de las muestras, únicamente se detectó CF como producto.

En cuanto a la recuperación de CF, ésta fue de 90% en presencia de SH suspendidas, y de 97% en presencia de SH inmovilizadas. Lo que indica que la adsorción de CF sobre la resina de intercambió iónico fue nula o despreciable. Es decir, prácticamente la totalidad de la concentración inicial de TCC deshalogenado (después de proceso de adsorción) se recuperó como CF. Existe evidencia de la formación de CF como producto de la reducción química de TCC (Curtis & Reinhard, 1994; Doong & Chiang, 2005), en donde además, se obtuvieron porcentajes de eliminación de TCC de hasta el 75% a los 26 días de incubación, utilizando cisteína como donador de electrones y AQDS (1 mM) como mediador redox. En el presente estudio, se obtuvieron porcentajes de eliminación de TCC de hasta 68% en un máximo de 168 horas, lo cual es aceptable en comparación al estudio (que llevaron a cabo Doong & Chiang, 2005). Además, las K obtenidas, en el estudio anterior, fluctuaron entre 7.52×10^{-7} y $1.6 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ en presencia de AQDS (1 mM) como mediador redox. Mientras que en el presente estudio, las K registradas fueron de aproximadamente $2 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$. Así mismo, los valores de K obtenidos, durante el presente estudio, fueron similares a las obtenidas en otro estudio, en el cual se llevó a cabo la deshalogenación reductiva de hexacloroetano (HCE), en donde se obtuvieron valores de K entre 2.1×10^{-6} y $12 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, en

soluciones con juglona (100 μM) como mediador redox. Lo anterior es aceptable, si se toma en cuenta que, el potencial de reducción de HCE es más alto que el de TCC, y por lo tanto la tasa de reducción de HCE sería mayor que la de TCC (Curtis & Reinhard, 1994).

Por otro lado, se detectó una pequeña cantidad de Cl^- (3 μM), al final de la incubación, únicamente en presencia de SH suspendidas. Era de esperarse una mayor concentración de Cl^- en presencia de SH suspendidas e inmobilizadas; puesto que, la recuperación en términos de cloro ligado al TCC, no fue del 100% en ningún caso. Lo anterior, podría deberse a que el Cl^- generado durante la reducción de TCC, fue secuestrado por las SH. Lo cual es posible, debido a que las SH también poseen sitios con cargas positivas en su estructura, como grupos amino (Stevenson, 1994), dichos sitios pudieron haber atraído al Cl^- , producto de la reducción de TCC. Por otro lado la posible presencia de metales (presentes en los elementos traza del medio mineral), acomplejados en las SH, pudieron funcionar como sitios con carga positiva (Yudov *et al.*, 2005), en donde el Cl^- fue secuestrado.

7.3. Reducción biológica de tetracloruro de carbono en presencia de sustancias húmicas

Durante la reducción biológica de TCC, en presencia de SH suspendidas, se obtuvieron como productos CF y DM (Figura 6.14). Hecho similar a lo reportado en otro estudio (Cervantes *et al.*, 2004), en donde se evaluó el impacto de la quinona modelo AQDS, en la deshalogenación de TCC, en presencia de lodo anaerobio. La ruta de deshalogenación propuesta en este caso se ilustra en la Figura 7.2.

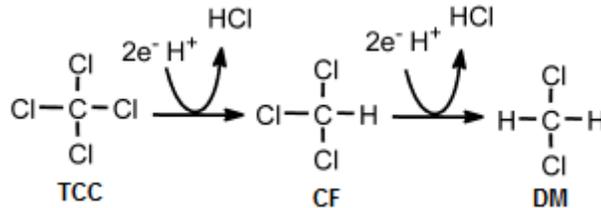


Figura 7.2 Formación de CF y DM propuesta para la cinética de reducción biológica de TCC.

La reducción biológica de TCC, en presencia de SH suspendidas arrojó un porcentaje de eliminación de TCC del 13%, en comparación al 75% obtenido en presencia de SH inmovilizadas, en términos del CF y DM recuperado. Incluso en ausencia de SH (control biológico, Figura 6.13), el porcentaje de eliminación de TCC fue de 19%. Lo que indica que la reducción de TCC, en presencia de SH suspendidas, no fue mejor que en ausencia de éstas. Es decir, la adición de SH suspendidas no tuvo un impacto favorable sobre la reducción de TCC. Lo cual es evidente al observar el consumo de glucosa, de la cual se utilizaron únicamente 5 mEq/L de los 40 mEq/L inicialmente disponibles. Lo anterior, podría deberse a que la concentración inicial de TCC (50 μM) en los experimentos, tuvo un papel inhibitorio en los experimentos en presencia de SH suspendidas y en ausencia de éstas. Fue reportado que la concentración mínima necesaria de TCC, para inhibir la actividad del 50% de la concentración (0.9 g SSV/L) de una población anaerobia metanogénica, fue de 40 μM . Lo anterior, a las 48 horas de incubación, a 35 $^{\circ}\text{C}$, pH neutro y una atmósfera $\text{N}_2:\text{CO}_2$ (Blum & Speece, 1991). Tal concentración de TCC (40 μM), fue incluso menor a la utilizada en los experimentos del presente estudio; además, la concentración de SSV fue 9 veces menor en el presente estudio. Es por lo anterior, que la causa de la baja bio-reducción de TCC se atribuyó a la toxicidad que la concentración inicial de TCC (50 μM) provocó sobre el consorcio PR.

En el caso de la bio-reducción de TCC en presencia de SH inmovilizadas, se detectó una concentración de 3.6 μM de TCC, al final de la incubación. Además, el porcentaje de recuperación de TCC, en términos de CF, fue del 75%. Hecho que indica que en presencia de SH inmovilizadas, no ocurrió la inhibición de la actividad del consorcio PR, debido a la concentración inicial de TCC (≈ 50

μM) adicionada. Lo que además se corroboró por consumo del 100% de la glucosa inicial adicionada (Tabla 6.7). Además, la K obtenida durante el proceso de bio-reducción de TCC, en presencia de SH inmovilizadas, fue de $1.5 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$, lo cual es casi 14 veces mayor que la obtenida en ausencia y presencia de SH suspendidas ($\approx 1.0 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$, ambas). Por otro lado, al igual que en la reducción química de TCC, ocurrió un proceso de adsorción en presencia de SH inmovilizadas, en la bio-reducción de TCC. Lo anterior, debido a la adsorción de TCC sobre la resina de intercambio iónico. Lo cual, se comprobó con un control endógeno en presencia de SH inmovilizadas (Figura 6.14). Sin embargo, después del proceso de adsorción (entre las 0 y 7 horas), la desaparición de TCC no inició inmediatamente. Ésta comenzó a las 24 horas, lo que implica que se presentó una fase de adaptación del consorcio PR, la cual finalizó hasta las 24 horas. A partir de ese momento dio inicio la desaparición de TCC. Además, el hecho de la existencia de una fase de adaptación en el control PR, se justifica por la aparición de CF hasta las 24 horas (Figura 6.14). Por otro lado, el porcentaje de recuperación de cloro ligado al TCC inicial (en el equilibrio, después de la adsorción), fue de alrededor del 55%, lo que corresponde a una concentración final de $30 \mu\text{M}$ de CF. Tomando en cuenta que hubo una desaparición de alrededor de $40 \mu\text{M}$ de TCC, y que no se detectó DM, como era de esperarse, de acuerdo a la ruta de deshalogenación propuesta (Figura 7.2). Es probable que el CF y el DM fueron adsorbidos sobre la resina de intercambio iónico, debido a que quizá ésta, gozaba de sitios activos disponibles (anteriormente ocupados por TCC), los cuales le permitieron adsorber CF y DM; además, de la cantidad de TCC que no se logró reducir.

Lo anterior, podría deberse a que la adsorción que se presentó durante las primeras 7 horas de incubación, propició la atenuación de la toxicidad del TCC, lo cual impidió la inhibición del consorcio PR. Así, al disminuir la concentración inicial de TCC, la bio-reducción de TCC pudo ocurrir. Se han realizado estudios, en donde se han utilizado sistemas bifásicos, para obtener altas tasas de biodegradación aerobia de compuestos orgánicos, con bajas solubilidades y alta toxicidad (Collins & Daugulis, 1999; Prpich & Daugulis, 2006; MacLeod & Daugulis,

2003), bajo el uso de sistemas bifásicos sólido-líquido o líquido-líquido. Lo anterior se ha logrado, gracias al uso de fases oleosas o sólidas (partículas poliméricas), las cuales se encuentran suspendidas en la fase acuosa. Así, estas fases oleosas o sólidas, son utilizadas para adsorber o disolver grandes concentraciones del contaminante (lo cual es posible, debido a la hidrofobicidad de los contaminantes, como es el caso del TCC; y a la afinidad de la fase seleccionada por el contaminante). Posteriormente, el contaminante en cuestión, después de ser “secuestrado” en la fase adsorbente, puede ser utilizado como sustrato por los microorganismos presentes en la fase acuosa, de acuerdo a sus necesidades metabólicas. Lográndose así, altas tasas de bio-degradación y superando la problemática de la toxicidad y la baja solubilidad de los contaminantes utilizados en los sistemas bifásicos (Daugulis, 2001).

De lo anterior, se puede entender, por qué el proceso de bio-reducción de TCC en presencia de SH inmovilizadas fue posible, mientras que en presencia de SH suspendidas no lo fue. Si bien, los experimentos de bio-reducción realizados en este estudio, no fueron concebidos bajo el concepto de sistemas bifásicos, es posible que algo similar haya ocurrido. Debido a la presencia de la resina de intercambio iónico, la cual representaría la fase sólida en el sistema. Es posible que un proceso de adsorción de TCC y posterior dosificación de éste a los microorganismos, haya ocurrido en las incubaciones en lote. Lo que no sólo permitió la utilización de TCC como aceptor final de electrones, sino que además, al estar las SH inmovilizadas sobre la superficie de la resina, se favoreció el contacto entre el TCC, las SH y el consorcio. Esta combinación permitió la bio-reducción de TCC; y que además, después de haber desaparecido en su totalidad, los grupos activos de la resina quedaron libres, y por ésta razón, la recuperación en términos de CF y DM no fue del 100%, en términos del TCC consumido. Lo que explicaría el hecho de que la cantidad específica de TCC adsorbida durante la reducción biológica de TCC (0.28mg TCC/g resina) fue mayor que la adsorbida durante la reducción química de TCC (0.14 mg TCC/g resina). Lo cual contrasta con la adsorción de CF y DM en la reducción biológica de TCC, y que no ocurrió en la reducción química de TCC. Sin embargo, puede estar justificado por la

posterior adsorción de CF y DM, una vez que el TCC fue eliminado de la resina de intercambio iónico.

Por otro lado, la K registrada (0.36 d^{-1}) fue mayor a la obtenida en otros estudios, en donde se reportaron K de entre 12.9×10^{-2} a $17.4 \times 10^{-2} \text{ d}^{-1}$, utilizando diversos donadores de electrones como glucosa e hidrógeno, en la bio-reducción de TCC, en presencia de AQDS como mediador redox. Además, de una recuperación de cloro ligado al TCC consumido del 59% en 27 días (Cervantes *et al.*, 2004). Mientras que en el presente estudio se obtuvo una recuperación de cloro ligada al TCC consumido de 55% a los 3.3 días de incubación (porcentaje quizá mayor, pero no determinado debido a la posible adsorción de CF y DM en la resina de intercambio iónico). Además, la K aquí obtenida es similar a la reportada en otro estudio (0.3 d^{-1}), en donde se llevó a cabo la reducción de TCC, mediante AQDS ($10 \text{ } \mu\text{M}$) como mediador redox en presencia de un lodo granular metanogénico, con una recuperación de cloro ligado al TCC reducido del 70%, a los 5 días de incubación (Gurrero & Field, 2005).

De acuerdo a los datos obtenidos durante la reducción biológica de SH, la reducción química y la reducción biológica de TCC; queda claro que la etapa limitante del proceso, es la reducción de TCC. Los datos cinéticos obtenidos durante la reducción biológica de SH, muestran que el consorcio PR logró transferir 24.7 y $9.5 \text{ } \mu\text{Eq/L-h}$ hacia las SH, suspendidas e inmovilizadas, respectivamente. Mientras que el consorcio U, logró transferir 16.6 y $5.5 \text{ } \mu\text{Eq/L-h}$ hacia las SH, suspendidas e inmovilizadas, respectivamente. Por otro lado, la transferencia de electrones de las SH, reducidas químicamente, hacia el TCC, fue de 1.7×10^{-2} y $1.2 \times 10^{-2} \text{ } \mu\text{Eq/L-h}$ en presencia de SH suspendidas e inmovilizadas, respectivamente. Lo que claramente indica que la tasa de transferencia de electrones (TTE) en la primera etapa del proceso (Figura 2.3), es 1435 veces más rápida en presencia de SH suspendidas y 792 veces más rápida en presencia de SH inmovilizadas, en comparación a las respectivas TTE (SH suspendidas e inmovilizadas) en la segunda etapa del proceso. Mientras que en la reducción biológica de TCC, la TTE desde las SH inmovilizadas hacia el TCC, fue de 3×10^{-2}

$\mu\text{Eq/L-h}$, valor el cual es 317 veces menor al obtenido durante la reducción biológica de SH inmovilizadas, por el consorcio PR.

De acuerdo a la transferencia de electrones, presentada en cada una de las etapas del proceso de deshalogenación reductiva (Figura 2.3), se concluyó que la segunda etapa del proceso (reducción de TCC), es la etapa limitante, y que por lo tanto, la hipótesis planteada en el presente estudio ha sido comprobada.

Este hecho está de acuerdo, con lo reportado por otros autores, en donde la etapa limitante de procesos de bio-reducción de contaminantes, es el paso de los electrones de mediadores redox, como quinonas hacia contaminantes, como en el caso del colorante amaranto (Rau *et al.*, 2002). Lo cual tiene que ver, con los potenciales redox (E_0') de los mediadores redox, mientras el E_0' del mediador redox es más negativo que el del contaminante a reducir, mayor será la tasa de degradación; siempre y cuando el E_0' del mediador redox se encuentre por debajo del donador de electrones (Guerrero & Field, 2005). Sin embargo, se determinó que esto no necesariamente aplica para contaminantes orgánicos halogenados, en donde la reducción del contaminante puede no depender de los potenciales redox, sino de la estructura del contaminante a reducir y de los radicales quinona presentes (Doong & Chiang, 2005). Por lo que no se puede atribuir, únicamente a los potenciales redox, el hecho de que la segunda etapa, en el proceso de reducción de TCC, haya sido limitante.

Por otro lado, en los experimentos aquí realizados, la presencia de la resina usada como soporte de inmovilización para las SH, fue determinante durante la reducción biológica de TCC. Efectivamente, la presencia de SH inmovilizadas atenuó la toxicidad de TCC, y propició la reducción del mismo, lo cual no fue posible en presencia de SH suspendidas. Finalmente, la etapa limitante fue consecuencia de varios factores: 1. El tipo de consorcio anaerobio utilizado, 2. Del contaminante a reducir (TCC), 3. De la particular estructura de las SH utilizadas (Leonardita), 4. De los E_0' de las SH y del TCC.

8. Conclusión y perspectivas

De acuerdo con los resultados obtenidos en éste estudio, se concluye lo siguiente:

Mediante la evaluación de los aspectos cinéticos de las etapas involucradas en el proceso de bio-reducción de TCC, en presencia de SH, se confirmó que la etapa limitante es la reducción química de TCC, por acción de las SH reducidas. Lo anterior, debido a una menor tasa de transferencia de electrones desde las SH reducidas hacia el TCC, en comparación a la tasa de transferencia de electrones desde el donador de electrones hacia las SH.

Se evaluaron dos consorcios anaerobios, para reducir SH suspendidas e inmovilizadas, y se encontró que el consorcio PR presentó una mayor capacidad de reducción, en comparación al consorcio U. Además, fue posible llevar a cabo la reducción de SH inmovilizadas, por ambos consorcios, por lo que la inmovilización de las SH no representa impedimento para ser reducidas, química o biológicamente. Sin embargo, las SH inmovilizadas exhibieron una CAE menor que las SH suspendidas, debido a limitaciones de transferencia de masa. También, se detectó que los donadores primarios de electrones, para llevar a cabo la reducción biológica de las SH, fueron acetato e hidrógeno, los cuales fueron producidos por la fermentación de la glucosa, adicionada como sustrato.

Así mismo, se evaluó la reducción de TCC, mediante SH suspendidas e inmovilizadas, reducidas química y biológicamente. Se encontró, que la tasa de reducción química de TCC, fue mayor en presencia de SH suspendidas. Por otro lado, la reducción biológica de TCC se llevó a cabo únicamente, en presencia de SH inmovilizadas, ya que, gracias a la adsorción de TCC, sobre la resina de intercambio iónico, fue posible atenuar la toxicidad del TCC. Por otro lado, se detectó CF como producto principal en la reducción de TCC, lo

que indica que la reducción de TCC, se llevó a cabo primordialmente, por la transferencia de un par de electrones.

Perspectivas

Uno de los aspectos a evaluar en futuras investigaciones, será la identificación y cuantificación de los radicales quinona formados a partir de la reducción de SH, durante la reducción de TCC. Debido a que las tasas de reducción de contaminantes halogenados, dependen en gran medida de la concentración en la que dichos radicales se encuentren.

Por otro lado, será necesario investigar a fondo, el tipo de microsistema que se forma sobre la resina de intercambio iónico, así como los aspectos relacionados a la difusión y transporte de masa. Existe la posibilidad de la formación de una bio-película sobre la resina, lo que implicaría un mejor transporte de masa, debido a la presencia de las SH y del TCC sobre la resina.

También, será importante explorar la aplicación de SH inmovilizadas en sistemas en continuo, para llevar a cabo procesos de bio-transformación de contaminantes. Ya que, gracias a la atenuación de la toxicidad de TCC mediante el uso de la resina de intercambio iónico, se podrían amortiguar incrementos de la concentración de TCC (o de otro tipo de contaminantes), en el flujo de agua a tratar.

9. Referencias

- Aranda-Tamura C., M. I. Estrada-Alvarado, A. Clexier, F. Cuervo, J. Gómez and F. J. Cervantes. (2007) Effects of different quinoid redox mediator on the removal of sulphide and nitrate via denitrification. *Chemosphere*. **69**, 1722-1727.
- ATSDR (2005) Toxicological profile for carbon tetrachloride. U. S. Department of Health and Human Services Public Health Service; Agency For Toxic Substances and Disease Registry.
- Aulenta F., A. Catervi, M. Majone, S. Panero, P. Reale and S Rossetti. (2007) Electron transfer from a solid-state electrode assisted by methyl viologen sustains efficient microbial reductive dechlorination of TCE. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 2554-2559.
- Barkovskii A. L and P. Adriaens. (1998) Impact of humic constituents on microbial dechlorination of polychlorinated dioxins. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**, 1013-1020.
- Benchtold, T., E. Burtscher and A. Turcanu. (1999) Anthraquinones as mediators for the indirect cathodic reduction of dispersed organic dyestuffs. *J. Electroanal. Chem.* **465**, 80-87.
- Benz M., B. Schink and A. Brune. Humic acid reduction by *Propionibacterium (1998) freudenreichii* and other fermenting bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4507-4512.
- Bhushan B., A. Halasz and J. Hawari. (2006) Effect of iron(III), humic acids and anthraquinone-2,6-disulfonate on biodegradation of cyclic nitramines by *Clostridium* sp. EDB2. *J. Appl. Microbiol.* **100**, 555-563.
- Blum D. J. and R. E. Speece. (1991) A database of chemical toxicity to environmental bacteria and its use in interspecies comparisons and correlations. *Res. J. Water. Pollut.C.* **63** (3). 198-207.

- Bond D. R. and D. R. Lovley. (2002) Reduction of Fe(III) oxide by methanogens in the presence and absence of extracellular quinines. *Environ. Microbiol.* **4**, 115-124.
- Borch T., W. P. Inskeep, J. A. Harwood and R. Gerlach. (2005) Impact of ferrihydrite and anthraquinone-2,6-disulfonate on the reductive transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by a gram-positive fermenting bacterium. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 7126-7133.
- Bradley P. M., Chapelle F. H. and D. R. Lovley. (1998) Humic acids acceptors for microbial oxidation of vinyl chloride and dichloroethene. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3102-3105.
- Burlage S., R. Atlas, D. Stahl D, G. Geesey. and G. Sayler (1998) Techniques in microbial ecology. *Oxford University Press*. 68-69.
- Cervantes F. J., S. van der Velde, G. Lettinga and J. A. Field. (2000) Competition between methanogenesis and quinone respiration for ecologically important substrate in anaerobic consortia. *Fems. Microbiol. Ecol.***34**, 161-171.
- Cervantes F. J., S. van der Velde, G. Lettinga and J. A. Field. (2000) Quinone as terminal electron acceptors for anaerobic microbial oxidation of phenolic compounds. *Biodegradation.* **11**, 313-321.
- Cervantes F. J., W. Dijksma, T. Duong-Dac, A. Ivanova, G. Lettinga and J. A. Field. (2001) Anaerobic mineralization of toluene by enriched sediments with quinones and humus as terminal electron acceptors. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 4471-4478.
- Cervantes F. J., F. A. de Bok, T. Duong-Dac, A. J. Stams and G. Lettinga. (2002) Reduction of humic substances by halorespiring, sulphate-reducing and methanogenic microorganisms. *Environ. Microbiol.* **4**, 51-57.

- Cervantes F. J., L. Vu-Thi-Thu, G. Lettinga and J. A. Field. (2004) Quinone-respiration improves dechlorination of carbon tetrachloride by anaerobic sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 702-711.
- Cervantes F. J., C. H. Gutiérrez, K. Y. López, M. I. Estrada-Alvarado, E. R. Meza-Escalante, A. C. Texier, F. Cuervo and L. Gómez. (2007) Contribution of quinone-reducing microorganisms to the anaerobic biodegradation of organic compounds under different redox conditions. *Biodegradation.* **19**, 235-246.
- Chen J., G. Bohua, A. R. Richard and D. B. Williams. (2003) The roles of natural organic matter in chemical and microbial reduction of ferric iron. *Sci. Total. Environ.* **307**, 167-178.
- Coates J. D., D. L. Ellis, E. L. Blunt-Harris, C. V. Gaw, E. E. Roden and Lovley D. R. (1998) Recovery of humic-reducing bacteria from a diversity of environments. *Appl. Environ. Microb.* **64**, 1504-1509.
- Collins L. D. and A. J. Daugulis (1999) Degradation of benzene, toluene, and *p*-xylene in a two-phase partitioning bioreactor: concept demonstration and practical application. *Biotechnol. Prog.* **15**, 74-80.
- Curtis G. P. and M. Reinhard. (1994) Reductive dehalogenation of hexachloroethane, carbon tetrachloride, and bromoform by anthrahydroquinone disulfonate and humic acid. *Environ. Sci. Technol.* **28**, 2393-2401.
- Danzo B. J. (1997) Environmental xenobiotics may disrupt normal endocrine function by interfering with the binding of physiological ligands to steroid receptors and binding proteins. *Environ. Health Perspect.* **105**, 294-301.
- Daugulis A. J. (2001) Two-phase partitioning bioreactors: a new technology platform for destroying xenobiotics. *Trends Microbiol.* **19** (11), 457-462.

- Doong R. and H. Chiang. (2005) Transformation of carbon tetrachloride by thiol reductants in the presence of quinone compounds. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 7460-7468.
- Dunnivant F. M. and R. P. Schwarzenbach. (1992) Reduction of substituted nitrobenzenes in aqueous solutions containing natural organic matter. *Environ. Sci. Technol.* **26**, 2133-2141.
- Egli C., R. Scholtz, A. M. Cook and T. Leisinger. (1987) Anaerobic dechlorination of tetrachloromethane and 1,2-dichloroethane to degradable products by pure cultures of *Desulfobacterium* sp and *Methanobacterium* sp. *FEMS Microbio. Lett.* **43**, 257-261.
- Egli C., T. Tschan, R. Scholtz, A. M. Cook and T. Lisinger. (1988) Transformation of tetrachloromethane to dichloromethane and carbon.dioxide by *Acetobacterium-woodii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2819-2824.
- Encinas-Yocupicio A. A., E. Razo-Flores, F. Sánchez-Díaz, A. B. dos Santos, J. A. Field and F. J. Cervantes. (2006) Catalytic effect of different redox mediator son the reductive decolorization of azo dyes. *Water. Sci. Technol.* **54**, 165-170.
- Fetzner S. (1998) Bacterial dehalogenation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 633-657.
- Field J. A., F. J. Cervantes, F. P. van der Zee and G. Lettinga. (2000) Role of quinone in the biodegradation of priority pollutants: a review. *Water. Sci. Technol.* **42**, 215-222.
- Finneran K. T. and Lovley D. R. (2001) Anaerobic degradation of methyl tert-butyl ether (MTBE) and tert-butyl alcohol (TBA). *Environ. Sci. Technol.* **35**, 1785-1790.

- Francis C. A., A. Y. Obratsova and B. M. Tebo. (2000) Dissimilatory metal reduction by the facultative anaerobe *Pantoea agglomerans* SP1. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 543-548.
- Fredrickson J. K., H. M Konstandarithes, S. W. Li, A. E. Plymale and M. J. Daly. (2001) Reduction of Fe(III), Cr(VI), U(VI), and Tc(VII) by *Deinococcus radiodurans* R1. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2006-2011.
- Galli R. and P. L. McCarty. (1989) Biotransformation of 1,1,1-trichloroethane, trichloromethane, and tetrachloromethane by a *Clostridium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 837-844.
- García A. (2008) Inmovilización de mediadores redox en matrices poliméricas y su aplicación en la biotransformación reductiva de un colorante azo. (M. en C. Tesis, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica). 1-2.
- Gordon L., W. R. Hartley, W. C. Roberts. (1991) Health advisory on hexachloroethane. U. S. Environmental Protection Agency, Office of Drinking Water. Washington D. C.
- Guerrero-Barajas C. and J. A. Field. (2005) Enhancement of anaerobic carbon tetrachloride biotransformation in methanogenic sludge with redox active vitamins. *Biodegradation.* **16**, 215-228.
- Guo J., J. Zhou, D. Wang, C. Tian, P. Wang, M. S. Uddin and H. Yu. (2007) Biocatalyst effects of immobilized anthraquinone on the anaerobic reduction of azo dyes by the salt-tolerant bacteria. *Water. Res.* **41**, 426-432.
- He Q. and R. A. Sandford. (2003) Characterization of Fe(III) reduction by chlororespiring *Anaeromyobacter dehalogenans* *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2712-2718.
- Jeykumari D. R., S. S. Kumar and S. S. Narayanan. (2005) Immobilization of redox mediators on functionalized carbon nanotube: a material for chemical sensor

- fabrication and amperometric determination of hydrogen peroxide. *Pramana*, **65**, 731-737.
- Kairu J. K. (1994) Pesticide residues in birds at lake Nakuru, Kenya. *Int. J. Salt Lake Res.* **3**, 31-48.
- Kappler A. and S. B. Haderlein. (2003) Natural organic matter as reductant for chlorinated aliphatic pollutants. *Environ Sci. Technol.* **37**, 2714-2719.
- Klavins M. and E. Apsite. (1997) Immobilization of humic substances. *IHSS – Polish Society of humic substances, Grunwaldzka*, **53**, 760-765.
- Klavins M. and L. Eglite. (2002). Immobilization of humic substances. *Colloid. Surface. A.* **203**, 47-54.
- Keck, A., J. Klein, M. Kudlich, A. Stolz, H. Knackmuss and R. Mattes. (1997) Reduction of azo dyes by redox mediators originating in the naphthalenesulfonic acid degradation pathway of *Sphingomonas* sp. strain BN6. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3684-3690.
- Kieft T. L., J. K. Fredrickson, T. C. Onstott, Y. A. Gorby, H. M. Kostandarithes, T. J. Bailey, D. W. Kennedy, S. W. Li, A. E. Plymale, C. M. Spadoni and M. S. Gray. (1999) Dissimilatory reduction of Fe(III) and other electron acceptors by a *Thermus* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1214-1221.
- Kim S. and F. W. Picardal. (1999) Enhanced anaerobic biotransformation of carbon tetrachloride in the presence of reduced iron oxides. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**, 2142-2150.
- Kriegman-king M. R. and M. Reinhard. (1991) Reduction of hexachloroethane and carbon tetrachloride at surfaces of biotite, vermiculite, pyrite, marcasite. En: Organic substances and sediments in water. *Lewis Publishers.* **2**, 349-364.
- Kudlich, M., A. Keck, J. Klein and M. Stolz. (1997) Localization of the enzyme system involved in anaerobic reduction of azo dyes by *Sphingomonas* sp.

- strain BN6 and effect of artificial redox mediators on the rate of azo dye reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3691-3694.
- Kukkadapu R. K., J. M. Zachara, S. C. Smith, J. K. Fredrickson and G. Liu. (2001) Dissimilatory bacterial reduction of Al-substituted goethite in subsurface sediments. *Geochim. Cosmochim. Ac.* **65**, 2913-2924.
- Kwon J. K. and Finneran K. T. (2008) Biotransformation products and mineralization potential for hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) in abiotic versus biological degradation pathways with anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS) and *Geobacter metallireducens*. *Biodegradation.* **1**, online.
- Li L., J. Wang, J. Zhou, F. Yang, C. Jin, Y. Qu, A. Li and L. Zhang. (2008) Enhancement of nitroaromatic compounds anaerobic biotransformation using a novel immobilized redox mediator prepared by electropolymerization. *Bioresource Technol.* **99** (15), 6908-6916.
- Lovley D. R. and E. J. Phillips. (1986) Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **51** (4), 683-689.
- Lovley D. R. and E. J. Phillips. (1989) Requirement for a microbial consortium to completely oxidize glucose in Fe(III)-reducing sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **55** (12), 3243-3236
- Lovley D. R., J. C. Woodward and F. H. Chapelle. (1996) Rapid anaerobic benzene oxidation with a variety of chelated Fe(III) forms. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 288-291.
- Lovley D. R., J. D. Coates, E. L. Blunt-Harris, E. J. P. Phillips, and J. C. Woodward. (1996) Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature.* **382**, 445-448.

- Lovley D. R., J. L. Fraga, J. D. Coates and E. L. Blunt-Harris. (1999) Humics as an electron donor for anaerobic respiration. *Environ. Microbiol.* **1**, 89-98.
- Lovley D. R. and E. L. Blunt-Harris. (1999) Role of humic-bound iron as an electron transfer agent in dissimilatory Fe(III) Reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (9), 4252-4254.
- Lovley D. R., K. Kashefi, M. Vargas, J. M. Tor and E. L. Blunt-Harris. (2000) Reduction of humic substances and Fe(III) by hyperthermophilic microorganisms. *Chem. Geol.* **169**, 289-298.
- MacLeod C. T. and A. J. Daugulis. (2003) Biodegradation of polycyclic hydrocarbons in a two-phase partitioning bioreactor in the presence of a bioavailable solvent. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**, 291-296.
- Mezohegyi G., A. Kolodkin, U. I. Castro, C. Bengoa, F. Stuber, J. Font and A. Fabregat. (2007) Effective Anaerobic decolorization of azo dye Acid orange 7 in continuous upflow packed-bed reactor using biological activated carbon system. *Ind. Eng. Chem. Res.* **46**, 6788-6792.
- O'Loughlin. (2008) Effects of electron transfer mediators on the bioreduction of lepidocrocite by *Shewanella putrefaciens* CN32. *Environ. Sci. Technol.* **42**, 6876-6882.
- Perlinger J. A., J. Buschmann, W. Angst and R. P. Schwarzenbach. (1996) Kinetics of the reduction of hexachloroethane by juglone in solutions containing hydrogen sulfide. *Environ. Sci. Technol.* **30**, 3408-3417.
- Picardal F. W., R. G. Arnold, H. Couch, A. M. Little and M. E. Smith. (1993) Involvement of cytochromes in the anaerobic biotransformation of tetrachloromethane by *Shewanella-putrfaciens* 200. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3763-3770.

- Prpich G. P. and A. J. Daugulis. (2006) Biodegradation of a phenolic mixture in a solid-liquid two-phase partitioning bioreactor. *Appl. Microbio. Biotechnol.* **72**, 607-615.
- Rau J., H. Knackmuss and A. Stolz. (2002) Effects of different redox mediators on the anaerobic reduction of azo dyes by bacteria. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 1497-1504.
- Rittmann B. E., McCarty P. L. (2001) Environmental biotechnology: principles and applications. New York: *McGraw Hill*.
- Safe S. H. (1994) Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* **24**, 87-149.
- Schulten H. R., B. Plage, M. Schnitzer. (1991) A chemical structure for humic substances. *Naturwissenschaften.* **78**, 311-312.
- Scott D. T., D. M. McKnight, E. L. Blunt-Harris, S. E. Kolesar and D. R. Lovley. (1998) Quinone moieties act as electron acceptors in the reduction of humic substances by humic-reducing microorganisms. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 2984-2989.
- Slobodkin A. I., T. P. Tourova, B. B. Kuznetsov, N. A. Kostrikina, and E. A. Bonch-Osmolovskaya. (1999) *Thermoanaerobacter siderophilus* sp. nov., a novel dissimilatory Fe(III)-reducing, anaerobic, thermophilic bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 1471-1478.
- Stevenson F. J. (1994) Humus chemistry: genesis, composition, reactions. John Wiley & Sons. New York, N. Y.
- Schwarzenbach R. P., R. Sterili and J. Zeyer. (1990) Quinone and iron porphyrin mediated reduction of nitroaromatic compounds in homogeneous aqueous solution. *Environ. Sci. Technol.* **24**, 1566-1574.

- Trump J. I., Y. Sun and J. D. Coates. (2006) Microbial interactions with humic substances. *Adv. Appl. Microbiol.* **60**, 55-96.
- U. S. Environmental Protection Agency. (2008) Halogenated organic compounds. [en línea] <http://www.epa.gov/>
- van der Zee, F. P., J. A. Field, G. Lettinga. (2000). The role of (auto)catalysis in the mechanism of anaerobic azo dye reduction. *Wat. Sci. Tech.* **42**, 301-308).
- van der Zee F. P., R. H. Bouwman, D. P. Strik, G. Lettinga and J. A. Field. (2001) Application of redox mediators to accelerate the transformation of reactive azo dyes in anaerobic bioreactors. *Biotechnol Bioeng.* **75**, 691-701.
- van der Zee F. P., I. A. Bisschops and G. Lettinga. (2003) Activated carbon as an electron acceptor and redox mediator during the anaerobic biotransformation of azo dyes. *Environ. Sci. Technol.* **37**, 402-408.
- Workman D. J., S. L. Woods, Y. A. Gorby, J. K. Fredrickson, and M. J. Truex. (1997) Microbial reduction of vitamin B₁₂ by *Shewanella alga* strain BrY with subsequent transformation of carbon tetrachloride. *Environ. Sci. Technol.* **31**, 2297-2297.