

**IPICYT**

**Instituto Potosino de Investigación Científica y  
Tecnológica**

**Posgrado en Ciencias Aplicadas**

**Impacto de sustancias húmicas inmovilizadas en la  
reducción de compuestos aromáticos  
nitrogenados**

Tesis que presenta:

**Jorge González Estrella**

Para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias Aplicadas**

En la opción de

**Ciencias Ambientales**

Director de Tesis

**Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo**

**San Luis Potosí, S.L.P., Octubre de 2009**



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “Impacto de sustancias húmicas inmovilizadas en la reducción de compuestos aromáticos nitrogenados” presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Aplicadas en la opción de Ciencias Ambientales fue elaborada por **Jorge González Estrella** y aprobada el **16 de octubre 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

\_\_\_\_\_  
Dr. José René Rangel Méndez  
Asesor de la tesis

\_\_\_\_\_  
Dr. Vladimir Alonso Escobar Barrios  
Asesor de la tesis



## Créditos institucionales

Esta tesis fue realizada en los laboratorios de Ingeniería y Biotecnología Ambiental, Análisis Instrumental, y Ecología y Cambio Global de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (211822) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. Este trabajo fue financiado por los proyectos SEP-CONACYT-55045 y Lettinga Award 2007, otorgado por la fundación Lettinga 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 028 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 26 días del mes de octubre del año 2009, se reunió a las 11:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

|  |                   |               |
|--|-------------------|---------------|
| <b>Dr. Vladimir Alonso Escobar Barrios</b>     | <b>Presidente</b> | <b>IPICYT</b> |
| <b>Dr. José René Rangel Méndez</b>             | <b>Secretario</b> | <b>IPICYT</b> |
| <b>Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo</b> | <b>Sinodal</b>    | <b>IPICYT</b> |

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

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

sustento el C.

**Jorge González Estrella**

sobre la Tesis intitulada:

***Impacto de sustancias húmicas inmovilizadas en la reducción de compuestos aromáticos nitrogenados***

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLO**

Dandose por terminado el acto a las 12:50 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 26 días del mes de octubre de 2009.

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



---

## Dedicatoria

A mis padres por ser siempre esa fuerza impulsora en mi vida personal y académica.

---

## Agradecimientos

Agradezco al Dr. Francisco J. Cervantes por la dirección del presente trabajo, quien siempre mostró total y completa disponibilidad pero sobre todo confianza en las actividades que desarrollé en la realización de éste. A la Dra. María Ana Pérez y Dra. Virginia Hernández quienes fueron un fundamental apoyo en la etapa experimental del presente trabajo. De igual manera agradezco los valiosos comentarios del Dr. René Rangel y el Dr. Vladimir Escobar durante la realización y en la revisión de esta tesis.

A la M.C Rebeca Pérez, M.C Dulce Partida y M.C Guillermo Vidriales por su cooperación para que se pudieran llevar adecuadamente los diferentes experimentos de este trabajo. Así mismo, agradezco el apoyo de Luis H. Álvarez y Ana Rosa Mancilla, quienes desinteresadamente me apoyaron en la experimentación constantemente.

Agradezco de forma personal a mis compañeros y sobre todo amigos del instituto Anita, Bere F., Kitzia, Sonia, Bere C., Arturo, Bernardo, Luis, Cesar, Josué, David y Pedro, quienes sin duda me brindaron, durante estos dos años, su amistad para que pudiera aprovechar la maestría de una manera diferente. También, agradezco muy especialmente a Rox y a sus padres: Mirella Farías y Arturo Olvera quienes fueron parte fundamental para que mi estancia en esta ciudad, fuera mucho más completa ya que a través de su cariño, vivencias y consejos siempre me hicieron sentir como en casa.

Finalmente, agradezco a mamá y papá, a mis hermanos Patty y Mario, a las tías y tíos y por supuesto a las abuelitas dado que siempre procuran estar cerca de mí, para apoyarme y escucharme cuando es necesario y sobretodo porque siempre han creído en mi.

## Contenido

|   |     |
|---|-----|
| Créditos institucionales .....  | iii |
| Dedicatoria .....   | v   |
| Agradecimientos.....  | vi  |
| Índice de Tablas .....  | ix  |
| Índice de Figuras.....  | x   |
| Resumen .....   | xii |
| Abstract .....  | xiv |
| 1. Introducción.....  | 1   |
| 2. Marco Teórico .....  | 4   |
| 2.1. Colorantes .....   | 4   |
| 2.2. Compuestos nitro-aromáticos .....  | 7   |
| 3. Impacto de las sustancias húmicas en la transformación de contaminantes<br>prioritarios..... | 11  |
| 3.1. MR en procesos de óxido-reducción (redox).....   | 12  |
| 4. Inmovilización de sustancias húmicas .....   | 19  |
| 5. Justificación.....   | 23  |
| 6. Objetivos e hipótesis .....  | 25  |
| 6.1. Objetivo general .....   | 25  |
| 6.2. Objetivos particulares .....   | 25  |
| 6.3. Hipótesis .....  | 25  |
| 7 Materiales y métodos .....  | 26  |
| 7.1 Activación y estabilización de biomasa .....  | 26  |
| 7.2 Selección de sustancias húmicas .....   | 26  |
| 7.3 Sulfonación de leonardita.....  | 27  |
| 7.4 Selección de resina .....   | 28  |
| 7.2 Experimentos de solubilidad .....   | 28  |
| 7.3 Relación masa volumen, cinética de adsorción e isothermas de<br>adsorción .....             | 29  |

---

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 7.4 | Pruebas de desorción .....  | 30 |
| 7.5 | Experimentos en lote de bio-transformación de RR2 y 4NF en presencia de LS adsorbida en resina Amberjet .....   | 31 |
| 8   | Resultados .....  | 36 |
| 8.1 | Activación de biomasa .....   | 36 |
| 8.2 | Sulfonación de leonardita.....  | 36 |
| 8.3 | Solubilidad de sustancias húmicas.....  | 37 |
| 8.4 | Relación masa/volumen, cinética de adsorción e isothermas de adsorción .....  | 41 |
| 8.5 | Pruebas de desorción .....  | 45 |
| 8.6 | Experimentos en lote de bio-transformación de RR2 y 4NF en presencia LS adsorbida en resina Amberjet .....  | 45 |
| 9   | Discusión de resultados .....   | 53 |
| 9.1 | Solubilidad de leonardita .....   | 53 |
| 9.2 | Adsorción de sustancias húmicas sulfonadas en una resina de intercambio iónico .....  | 56 |
| 9.3 | Experimentos en lote de bio-transformación de RR2 en presencia de LS disuelta y adsorbida en resina Amberjet y de 4NF en presencia de LS adsorbida en resina Amberjet ..... | 61 |
| 10  | Conclusiones y actividades futuras .....  | 68 |
| 11  | Referencias.....  | 70 |

## Índice de Tablas

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 3.1 | Impacto de distintos MR en la bio-transformación de diferentes colorantes azo en sistemas en lote y flujo continuo   | 14 |
| 3.2 | Efecto de MR sobre la transformación de diferentes compuestos nitro-aromáticos bajo condiciones abióticas y bióticas | 17 |
| 8.1 | Análisis de COT disuelto a SH con distintos tratamientos   | 38 |
| 8.2 | Porcentaje de desorción en resinas amberjet cubiertas de leonardita sulfonada  | 45 |
| 8.3 | Porcentajes de decoloración de RR2 observadas en diferentes condiciones experimentales                               | 49 |
| 8.4 | Tasas de decoloración de RR2 observadas en diferentes condiciones experimentales                                     | 50 |

## Índice de Figuras

|      |  |    |
|------|--|----|
| 2.1  | Estructuras de diversos colorantes utilizados por la industria textil, para los procesos de tinción                              | 7  |
| 3.1  | Reacciones abióticas (líneas solidas) y bióticas (líneas punteadas) involucradas en la oxidación y reducción de mediadores redox | 13 |
| 3.2  | Mecanismo general de reacción en la reducción biótica de compuestos electrofílicos en presencia de MR                            | 14 |
| 7.1  | Estructura de 4-nitrofenol   | 32 |
| 7.2  | Estructura de rojo reactivo 2  | 32 |
| 8.1  | Espectro infrarrojo de LS y LC   | 36 |
| 8.2  | Efecto de diferentes parámetros en la solubilidad de LS. Tratamiento: 1: Sulfonado 2: No sulfonado                               | 38 |
| 8.3  | Gráfica de superficie de respuesta para la optimización de solubilidad de LC   | 39 |
| 8.4  | Gráfica de contorno para la solubilidad LS en términos de COT disuelto   | 40 |
| 8.5  | Efecto de la relación masa/volumen (m/V) en la adsorción de LS.  | 41 |
| 8.6  | Cinética de adsorción de COT en resina Amberjet.   | 42 |
| 8.7  | Isoterma de adsorción de LS en resina Amberjet.  | 43 |
| 8.8  | Espectro infrarrojo de la resina, LS adsorbida en resina Amberjet y LS   | 44 |
| 8.9  | Espectro infrarrojo de LS adsorbida en resina (Resina LS), leonardita control (LC) y leonardita sulfonada (LS)                   | 44 |
| 8.10 | Cinética de conversión de 4NF por un lodo metanogénico disgregado en presencia de LS adsorbida en resina Amberjet.               | 46 |
| 8.11 | Cinética de segundo orden de decoloración de RR2 por un lodo metanogénico disgregado en presencia de LS adsorbida en resina      | 48 |

|      |   |    |
|------|---|----|
| 8.12 | Barrido espectrofotométrico de los tratamientos utilizados en presencia con 100 mg COT/L disuelto e inmovilizado  | 51 |
| 8.13 | Comparación del espectro infrarrojo de la resina cubierta con LS y la resina cubierta con LS utilizada en los ensayos de la cinética de bio-transformación de RR2   | 52 |
| 9.1  | Fracción de una estructura modelo de un ácido húmico sulfonada  | 55 |
| 9.2  | Mecanismo de adsorción entre resina Amberjet y leonardita sulfonada   | 59 |
| 9.3  | Interacción de RR2 con leonardita sulfonada disuelta e inmovilizada   | 63 |
| 9.4  | Auto-catálisis de 4 NF propiciada por el equilibrio 4 amino-fenol y 4 amino quinona.  | 66 |
| 9.5  | Mecanismo de reducción de RR2 en presencia de leonardita sulfonada inmovilizada en una resina de intercambio iónico la cual funciona como mediador redox aceptando los electrones de la glucosa, oxidada por los microorganismos, y transfiriéndolos al enlace azo del RR2 propiciando por una lado su reducción y por otro la formación de una amina aromática | 67 |

## Resumen

Impacto de sustancias húmicas inmovilizadas en la reducción de compuestos aromáticos nitrogenados

**PALABRAS CLAVE:** sustancias húmicas, inmovilizadas, compuestos nitrogenados, bio-transformación

Los compuestos nitrogenados aromáticos forman parte del grupo de contaminantes prioritarios. Dentro de este grupo, la liberación al ambiente de los colorantes azo ( $R-N=N-R$ ) es indeseable tanto por sus efectos estéticos en donde son vertidos, como por sus características tóxicas y/o mutagénicas. Así mismo, los compuestos nitro-aromáticos poseen propiedades que provocan efectos dañinos a la salud humana, por lo que su eliminación del ambiente es de actual interés para diversos sectores. Estos dos tipos de contaminantes nitrogenados aromáticos comparten la característica de ser recalcitrantes bajo condiciones aerobias, por lo que ambientes anaerobios han promovido su bio-transformación.

Si bien es cierto que los tratamientos anaerobios han dado resultados alentadores en la transformación de dichos contaminantes, se ha observado que el proceso ocurre lentamente, por lo que la adición de sustancias húmicas, como mediadores redox, ha dado resultados generalmente positivos en el incremento de la velocidad de la reacción. Sin embargo, agregar sustancias húmicas constantemente, es un inconveniente porque requiere continua dosificación e incrementa los costos totales de operación. Debido a esto, en los últimos años ha surgido el interés de encontrar técnicas que permitan evitar la pérdida de las sustancias húmicas en un régimen continuo de operación.

En el presente trabajo se utilizó la técnica de sulfonación en leonardita, sustancia húmica proveniente de la oxidación natural de la lignita, para insertar el grupo  $SO_3H$  en la leonardita y así aumentar su solubilidad y capacidad de intercambio iónico. La inserción de dicho grupo en la leonardita se constató mediante la

técnica de espectroscopia de infrarrojo. Así mismo, la medición de carbón orgánico total disuelto se utilizó para comprobar el aumento de la solubilidad inducida por la sulfonación, mediante dicho análisis se observó un incremento 5.5 veces de carbón orgánico disuelto de leonardita sulfonada respecto a la leonardita sin el tratamiento de sulfonación.

En los experimentos de adsorción, se utilizó una resina esférica de intercambio iónico como matriz para llevar a cabo la adsorción de la leonardita sulfonada. A través de isothermas de adsorción se encontró que la capacidad máxima de adsorción fue de 40 mg COT/ g resina. Igualmente se desarrollaron pruebas de desorción en las cuales se encontró que la desorción de leonardita fue mayor del 15% cuando la resina había adsorbido < 5 mg COT/ g resina y menor del 5% de desorción cuando se adsorbió cantidades > 30 mg COT/ g resina.

Para finalizar, se realizaron experimentos de bio-transformación de un colorante azo (rojo reactivo 2) en presencia de leonardita disuelta e inmovilizada en una resina de intercambio iónico y de un compuesto nitro-aromático (4-nitrofenol) en presencia de LS leonardita inmovilizada en una resina de intercambio iónico. En las pruebas con el colorante, se encontró que la presencia de leonardita inmovilizada incrementó 2.5 veces la tasa de decoloración respecto al control biológico sin sustancias húmicas. Mientras que en el experimento con 4-nitrofenol, la presencia de la leonardita inmovilizada no aumentó la tasa de bio-transformación.

La técnica de inmovilización de sustancias húmicas desarrollada en el presente estudio constituye una alternativa viable para aplicarla en reactores anaerobios de tratamiento de aguas residuales industriales. Particularmente, el empleo de sustancias húmicas inmovilizadas con estos fines permitirá acelerar los procesos de óxido-reducción implicados en la biotransformación de una amplia gama de contaminantes recalcitrantes.

## Abstract

Impact of immobilized humic substances on the reduction of nitrogenated aromatic compounds

KEY WORDS: humic substances, immobilized, nitrogenated aromatic compounds, bio-transformation

Nitrogenated aromatic compounds belong to the group of priority pollutants. Within this group, the release of azo dyes ( $R-N = N-R$ ) to the environment is undesirable both for their aesthetic effects in the water bodies where they are poured, and for its toxic and / or mutagenic characteristics. Besides, nitro-aromatic compounds have properties that cause harmful effects on human health, thus their elimination of the environment is a current interest for several society sectors. These two types of nitrogenated aromatic pollutants share the characteristic of being recalcitrant under aerobic conditions, thus anaerobic environments have promoted their biotransformation.

Anaerobic treatment has shown good results in the transformation of these pollutants, but it has been observed that the process occurs slowly; hence the addition of humic substances, as redox mediators, has had positive results in increasing the rate of the reaction. However, because it is necessary the constant addition of humic substances under a continuous flow regimen, the treatment cost increases. Because of that, in recent years there has been interest on finding techniques to prevent loss of humic substances under the mentioned conditions.

In the present study it was used the sulfonation methodology in leonardite, humic substance formed as a result of natural oxidation of lignite, to introduce the  $SO_3H$  group and thereby increase its solubility and ion exchange capacity. The addition of this group in leonardite, was confirmed by infrared spectrometry. Also, the measurement of total dissolved organic carbon was used to assess the changes in

solubility in leonardita once it was sulfonated, this analysis showed that leonardita increase 5.5 times the amount of total dissolved organic carbon with the sulfonation treatment.

In the adsorption experiments, it was used a spherical ion exchange resin as a matrix to carrying out the adsorption of sulfonated leonardite. In this experiment, it was found that the maximum capacity of adsorption was 40 mg TOC / g resin. Also desorption tests were conducted, in which it was found above 15% of desorption when the resin had adsorbed <5 mg TOC / g resin and below 5% of desorption when adsorbed amounts > 30 mg TOC / g resin.

Finally, biotransformation experiments of an azo dye (reactive red 2) were performed in the presence of leonardite both soluble and immobilized on ion exchange resins. Also an experiment of a nitro-aromatic compound (4-nitrophenol) was carried out in the presence of immobilized leonardite on an ion exchange resin. In the tests with the dye, it was found that the presence of immobilized leonardite increased 2.5 times the rate of decolorization in comparison with the biological control without humic substances. While in the experiment with 4-nitrophenol, the presence of immobilized leonardite did not increase the biotransformation rate.

The technique developed in the present study to immobilize humic substances constitutes a feasible alternative to be applied in the treatment of industrial waste water in anaerobic reactors. Specifically, the application of the immobilized humic substances with this objective, will allow increasing the rates of the redox processes that are involved in the biotransformation of a wide variety of recalcitrant pollutants.

## 1. Introducción

A lo largo de los años las actividades y procesos industriales han tenido una importante contribución a la economía global. No obstante, acompañada de este desarrollo, la industrialización ha tenido como consecuencia la formación de productos que son liberados en forma de agua residual, emisiones gaseosas o residuos sólidos provocando efectos dañinos en salud humana y deterioro del medio ambiente. Dada la importancia de lo anterior, ha surgido la necesidad de desarrollar tecnologías que permitan darle un tratamiento adecuado a dichos contaminantes.

Existen, dentro de este amplio grupo de contaminantes, compuestos que, además de poseer características recalcitrantes, contienen uno o más grupos electrofílicos en su estructura, lo que provoca que compitan con el oxígeno por los electrones que darían lugar a su transformación, por esta razón un proceso aerobio resulta inadecuado para darles tratamiento. Dentro de este grupo de contaminantes electrofílicos se pueden mencionar a los compuestos azo, polihalogenados y nitroaromáticos (Field *et al.*, 2000). Contrario a los sistemas aerobios, existen diversos estudios donde se ha reportado que la transformación bajo condiciones anaerobias fue posible. En efecto, reactores anaerobios de alta tasa, como los sistemas basados en lechos de lodo granular de flujo ascendente (UASB y EGSB), han mostrado altas tasas de conversión de este tipo de contaminantes (Razo, 1997, Horber *et al.*, 1999; Rajaguru *et al.*, 2000; O'Neill *et al.*; 2000).

Sin embargo, muchos de estos contaminantes electrofílicos requieren de varios días para lograr su reducción en este tipo de sistemas de tratamiento (Dunnivant *et al.*, 1992, Field & Brady, 2003). En algunos casos inclusive, los sistemas anaerobios han colapsado debido a la toxicidad de algunos contaminantes (van der Zee *et al.*, 2001). Si bien es cierto que el uso de procesos anaerobios en el tratamiento de aguas residuales, en la bio-transformación de compuestos electrofílicos, ha dado buenos resultados, la transferencia de electrones del

donador de electrones (co-sustrato) al aceptor terminal de electrones (contaminante), generalmente representa el aspecto limitante en el proceso de redox (van der Zee, 2002).

Ante este inconveniente, la adición de transportadores de electrones o mediadores redox (MR) ha mostrado un aumento en las tasas de transformación de diversos grupos de contaminantes electrofílicos (Schwarzenbach *et al.*, 1990; Curtis *et al.*, 1994; Perlinger *et al.*, 1996; Kudlich *et al.*, 1997; van der Zee *et al.*, 2000; Cervantes *et al.*, 2001). Incluso, el uso de mediadores redox, no sólo ha sido relevante en la transformación de contaminantes; sino también, ha demostrado ser útil en la rehabilitación de sistemas biológicos colapsados, como el reportado por van der Zee *et al.* (2001).

En dichos estudios, se ha indicado que las sustancias húmicas (SH), compuestos generalmente asociados con características estructurales muy estables y donde las quinonas son muy abundantes, pueden jugar un papel muy importante en la transformación de compuestos orgánicos actuando como MR. Aún cuando estas propiedades catalíticas de las SH, y de las quinonas presentes en ellas, han revelado un uso promisorio para el tratamiento de cuerpos de agua contaminados con diversos contaminantes recalcitrantes, su dosificación a los sistemas de tratamiento debe ser de manera continua, lo que resulta en un mayor costo de operación (van der Zee *et al.*, 2003; Ceballos *et al.*, 2005; Mezohegyi *et al.*, 2007).

En relación a este inconveniente que representa la dosificación continua de MR y considerando el papel importante que pueden jugar las SH en la transformación de contaminantes, existen pocos estudios que hayan sido dirigidos a la inmovilización de éstas con el objeto de utilizarlas en la bio-transformación de dichos contaminantes (Cervantes *et al.*, 2003; Ceballos *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2007, García, 2008). Sin embargo, aún cuando son pocos los estudios realizados, los resultados obtenidos vislumbran una perspectiva interesante respecto a la

aplicación de SH inmovilizadas en sistemas de tratamiento de aguas residuales (García, 2008).

En efecto, uno de los actuales intereses, de diversos grupos de investigación, es encontrar mecanismos de inmovilización de MR adecuados, que eviten su dosificación continua en sistemas de tratamiento de efluentes industriales. Lo anterior, permitiría reducir los costos operativos de sistemas de tratamiento capaces de reducir diferentes contaminantes recalcitrantes a altas tasas de conversión. De aquí la importancia de encontrar los materiales y condiciones que permitan inmovilizar las SH sin que éstas pierdan sus propiedades catalíticas. De igual forma, es necesario determinar la configuración, características y parámetros de control del sistema de tratamiento en el que se inmovilicen las SH, con el fin de establecer un proceso de conversión eficiente.

## 2. Marco Teórico

Diversos sectores industriales se han caracterizado por descargar grandes cantidades de componentes tóxicos a cuerpos de agua. Dentro de estos sectores, las industrias petroquímica, textil y farmacéutica han sido identificadas como las principales fuentes de desechos recalcitrantes y tóxicos. Por la variedad y características recalcitrantes de los contaminantes presentes en sus efluentes, se ha determinado que los métodos tradicionales de tratamiento de aguas residuales no son los adecuados para dichos efluentes (Cervantes *et al.*, 2001; dos Santos *et al.*, 2004; Anjaneyulu *et al.*, 2005), por lo que es necesario encontrar sistemas de tratamiento que permitan degradar sus contaminantes con mayor eficiencia (Mezohegyi *et al.*, 2007).

Dentro de este amplio grupo de contaminantes se pueden destacar a los colorantes, compuestos polihalogenados y compuestos nitro-aromáticos, los cuales se asemejan por ser recalcitrantes y por la presencia de grupos electrofílicos en su estructura. Lo anterior, impide que tratamientos aerobios convencionales sean propicios para degradarlos (Field & Brady, 2003). En la siguiente sección, se describen, de manera general, las características de estos contaminantes encontrados en los cuerpos de agua.

### 2.1. Colorantes

La presencia de colorantes, vertidos sin tratamiento en diferentes cuerpos de agua, es un indicador visual de contaminación debido al cambio de color natural del cuerpo de agua. Lo anterior, no sólo tiene implicaciones estéticas; sino también, un efecto de desequilibrio en la absorción natural de luz en el agua y en el ciclo de fotosíntesis de las plantas acuáticas. Además, su presencia aumenta los niveles de toxicidad e introduce un peligro potencial por bioacumulación que podría impactar directamente a los organismos que habitan en el ecosistema,

afectando eventualmente al hombre como consecuencia del transporte de materia a través de la cadena alimenticia (van der Zee *et al.*, 2001; dos Santos *et al.*, 2004; Anjaneyulu Y. *et al.*, 2005).

Todos los compuestos aromáticos absorben energía electromagnética pero sólo aquellos que absorben a una longitud de onda dentro del intervalo de luz visible (~350-700 nm) son los que reflejan color. Los colorantes contienen cromóforos con sistemas de electrones deslocalizados, con doble enlace e igualmente contienen auxocromos. Además, contienen grupos funcionales que actúan como aceptores o donadores de electrones y que pueden intensificar o causar el color de la estructura mediante la alteración de la energía del sistema de electrones. Los cromóforos usuales son  $-C=C-$ ,  $-C=N$ ,  $-C=O$ ,  $-N=N-$ ,  $-NO_2$  y anillos quinoidales y, por otra parte, los auxocromos comunes son  $-NH_3$ ,  $-COOH$ ,  $-SO_3H$  y  $-OH$  (van der Zee, 2002).

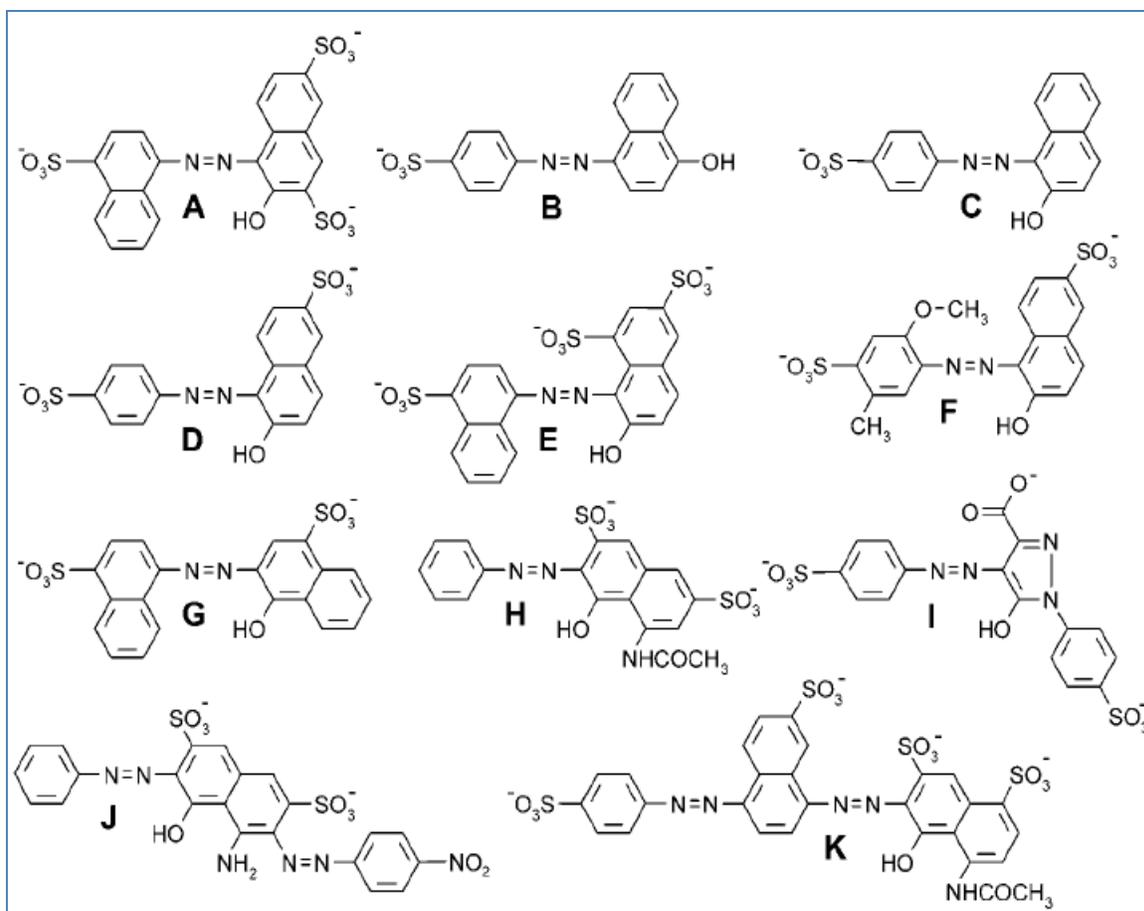
La cifra de colorantes actualmente producidos por la industria química es de más 8000 tipos, siendo las industrias textil, papelera, farmacéutica y de curtiduría las que más consumen colorantes. Además, estos sectores utilizan grandes cantidades de agua en sus procesos de manufactura, por lo que contribuyen en mayor medida a la descarga de este tipo de contaminantes a los cuerpos de agua (Anjaneyulu *et al.*, 2005). La industria textil es uno de los sectores más importantes bajo este contexto debido a la alta demanda que existe en el mercado por las telas, y por las implicaciones económicas que existen alrededor de dicha industria. Se estima que la producción anual de telas supera el millón de toneladas (dos Santos, 2005).

Durante el proceso de tinción de telas, alrededor del 40% de los colorantes termina en los efluentes debido a la pobre fijación de muchos de estos productos. Además, este sector genera de 40 a 60 L de agua residual por kg de tela producida (Mezohegyi *et al.*, 2007). Los colorantes tienen estructuras difíciles de degradar debido a su estructura compleja, origen sintético y naturaleza

recalcitrante. Aunado a esto, una sencilla operación de coloración puede arrojar una gran variedad de compuestos, lo que representa un reto difícil para los sistemas de tratamiento de agua.

Con base en la estructura química y cromófora; de 20 a 30 grupos de colorantes pueden ser clasificados, de los cuales se pueden destacar, por su importancia cuantitativa, a los colorantes azo (monoazo, diazo, triazo, poliazo), antraquinona, ftalocianina y triarilmetano. La asociación americana de químicos y coloristas textiles enumera a 15 diferentes tipos de colorantes con base en su aplicación (van der Zee, 2002). En la Figura 2.1 se muestran algunos tipos de colorantes utilizados por diversos procesos de coloración.

Actualmente, más de un millón de toneladas métricas de colorantes son producidas, de las cuales 70% en peso corresponden a los colorantes tipo azo ( $R_1-N=N-R_2$ ) (dos Santos *et al.*, 2003). Debe mencionarse que, además de la evidente problemática ambiental que los colorantes generan, algunos de ellos y sus productos de bio-transformación tienen efectos altamente tóxicos y cancerígenos (van der Zee, 2002; Field & Brady, 2003). Pese a la evidente problemática, no existe aún un tratamiento único y adecuado para tratar estos efluentes a escala industrial, y la liberación de este tipo de compuestos al medio ambiente ocasiona, como se mencionó anteriormente, severos problemas ambientales y de salud pública (Mezohegyi *et al.*, 2007).



**Figura 2.1** Estructuras de diversos colorantes utilizados por la industria textil, para los procesos de tinción: Tomada de Rau *et al*, 2002. A: rojo ácido 27; B: Naranja ácido 20; C: Naranja ácido 7; D: Amarillo alimento; E: Rojo ácido 18; F: Rojo alimento 17; G: Rojo ácido 14; H: Rojo ácido 1; I: Amarillo ácido 23; J: Negro ácido 1; K: Amarillo alimento.

## 2.2. Compuestos nitro-aromáticos

Los compuestos nitro-aromáticos forman un grupo de contaminantes que tienen implicaciones importantes para el medio ambiente debido a que son altamente recalcitrantes y tóxicos. La mayoría de los compuestos nitro-aromáticos han sido inducidos a los ecosistemas naturales por actividades antropogénicas, ya que pueden ser producidos como consecuencia de una combustión incompleta; o por una inadecuada disposición final luego de ser utilizados en los procesos en los cuales son materia prima o intermediarios sintéticos. Los compuestos nitro-aromáticos son normalmente utilizados como agentes químicos utilizados en la fabricación de explosivos, colorantes, espuma de poliuretano, herbicidas, insecticidas y disolventes (Spain, 1995; Hofstetter *et al.*, 1999).

La contaminación generada por estos compuestos, además de tener implicaciones ambientales, es de interés ya que tienen efectos importantes en la salud humana. Estos compuestos pueden penetrar la piel, con relativa facilidad, induciendo la formación de metemoglobina bajo exposiciones agudas; o bien, anemia bajo condiciones crónicas. De igual manera, por exposición a estos compuestos, se han encontrado casos de irritaciones, daño en hígado y generación de tumores (OMS, 2009). Los nitro-aromáticos son contaminantes generalmente persistentes a los tratamientos biológicos aerobios y permanecen por largos periodos de tiempo en el ambiente, donde constituyen una fuente de efectos adversos para los organismos del ecosistema. Ejemplos de compuestos nitro-aromáticos son 2, 4, 6-trinitro-tolueno (TNT), o hexa-hidro 1, 2, 3-trinitro-1, 3, 5- triazina (RDX) y 4-nitrofenol (4NF).

El RDX es un explosivo ampliamente utilizado alrededor del mundo que ha sido detectado como contaminante en diversos lugares, de los cuales se puede mencionar a los almacenes de municiones, campos de entrenamiento militar, entre otros (Hans *et al.*, 1990). El RDX es un contaminante de prioridad ambiental debido a que es moderadamente soluble a bajas concentraciones, por lo que puede ser transportado de una fase sólida a un acuífero con relativa facilidad y sus efectos son de interés en la salud a causa de su potencial para inducir cáncer, siendo 2 µg/L el límite máximo permisible para exposición humana (EPA, 2004).

El RDX está constituido por una estructura cíclica con átomos de nitrógeno y es altamente resistente a la degradación aerobia (Bradley & Chapelle, 1995), aunque existen microorganismos específicos capaces de degradarlo aeróbicamente (Fournier *et al.*, 2005); sin embargo, considerando que la concentración de oxígeno disponible en aguas subterráneas es muy baja, la degradación de éste en condiciones naturales se complica, por lo que la degradación anaerobia se presenta como una alternativa viable para dar tratamiento a este contaminante (Kwon & Finneran, 2006).

Por otra parte, el TNT es un compuesto con una alta dispersión en el medio ambiente y de extrema preocupación, debido a sus efectos mutagénicos, carcinogénicos y tóxicos. Marozziene *et al* (2002), al comparar la actividad de la estructura en la formación de metemoglobina en eritrocitos humanos en presencia de diferentes explosivos nitro-aromáticos, encontraron que el TNT fue el mayor precursor de dicha sustancia. El TNT es absorbido vía tracto digestivo, piel o bien por vías respiratorias, se han presentando casos de toxicidad por parte del TNT predominantemente en trabajadores de minas o de la industria química después de haber estado en contacto permanente con éste (Hathaway *et al.*, 1985). Además, el TNT se ha encontrado en el suelo, agua superficial y subterránea debido a liberación de éste por parte de las fábricas de explosivos y de municiones (Williford *et al.*, 1999 y Talmage *et al.*, 1999). Debido a esto, la intoxicación por TNT puede inducirse a través de la ingesta de agua y alimentos contaminados (Ryon y Ross, 1990).

Este compuesto, además, es altamente recalcitrante a la mineralización microbiana en ambientes aerobios. El efecto de aceptor de electrones de los tres grupos nitro de la molécula de TNT previene la oxidación del anillo aromático. La transformación del TNT comúnmente inicia con la reducción del grupo nitro al grupo hidroxilamina o amino. La reducción puede ser iniciada biológicamente por las enzimas o por agentes químicos reductores, tales como hierro elemental. En la presencia de una fuente de carbono disponible, el TNT puede ser degradado bajo condiciones aerobias; sin embargo, un ambiente reductor es favorable para acelerar la reacción. La reducción del TNT es co-metabólica, es decir necesita la presencia externa de una fuente de carbono y nitrógeno (Thomas & Gerth, 2005).

El 4NF es un nitroaromático típicamente encontrado en los efluentes de industrias farmacéuticas, curtidoras, agroquímica y colorantes, además de ser generado como matriz acuosa para la formulación, distribución y aplicación de pesticidas en campo, lo que hace de este contaminante de particular interés por su efecto en

suelo y en aguas subterráneas. Su estructura aromática consta de un grupo fenólico que orienta en la posición *para* a un grupo nitro, su estructura al igual que la de los otros compuestos nitro-aromáticos impide una degradación en condiciones aerobias, sin embargo es factible su transformación bajo condiciones anaerobias (Tomei *et al.*, 2008).

Sus efectos en la salud pueden ser agudos como dolor de cabeza, somnolencia, cianosis e irritación en los ojos. En pruebas con murinos se ha demostrado que existe un incremento en la metemoglobina y opacidad de la cornea, pruebas similares han demostrado efectos tóxicos por vía tópica y oral. Hasta este momento no se cuenta con información que demuestren efectos crónicos en humanos y animales por inhalación o ingestión y no se ha demostrado su potencial como compuestos carcinógeno (EPA, 2007).

### **3. Impacto de las sustancias húmicas en la transformación de contaminantes prioritarios**

El humus es la fracción de materia orgánica más abundante de la biósfera que se acumula en el suelo y en los sedimentos acuáticos. Su estructura está formada por diferentes polímeros complejos que son muy resistentes a la degradación, por lo que se considera la fracción más estable de la materia orgánica, lo cual se evidencia por su tiempo de residencia de 250 a 1900 años (Stevenson, 1994). El humus está compuesto por moléculas amorfas oscuras de sustancias orgánicas de alto peso molecular, que resultan de la bio-transformación y polimerización de fenoles y compuestos aromáticos de desechos orgánicos como lignina, taninos y metabolitos secundarios. En estudios recientes, se ha indicado que el humus y específicamente las quinonas, grupos funcionales muy abundantes en el humus, pueden jugar un papel importante en la bio-transformación de una amplia gama de compuestos orgánicos e inorgánicos.

El humus y los compuestos análogos del mismo han demostrado tener tres distintos papeles que coadyuvan en la transformación abiótica y biológica de contaminantes prioritarios (Field *et al.*, 2000):

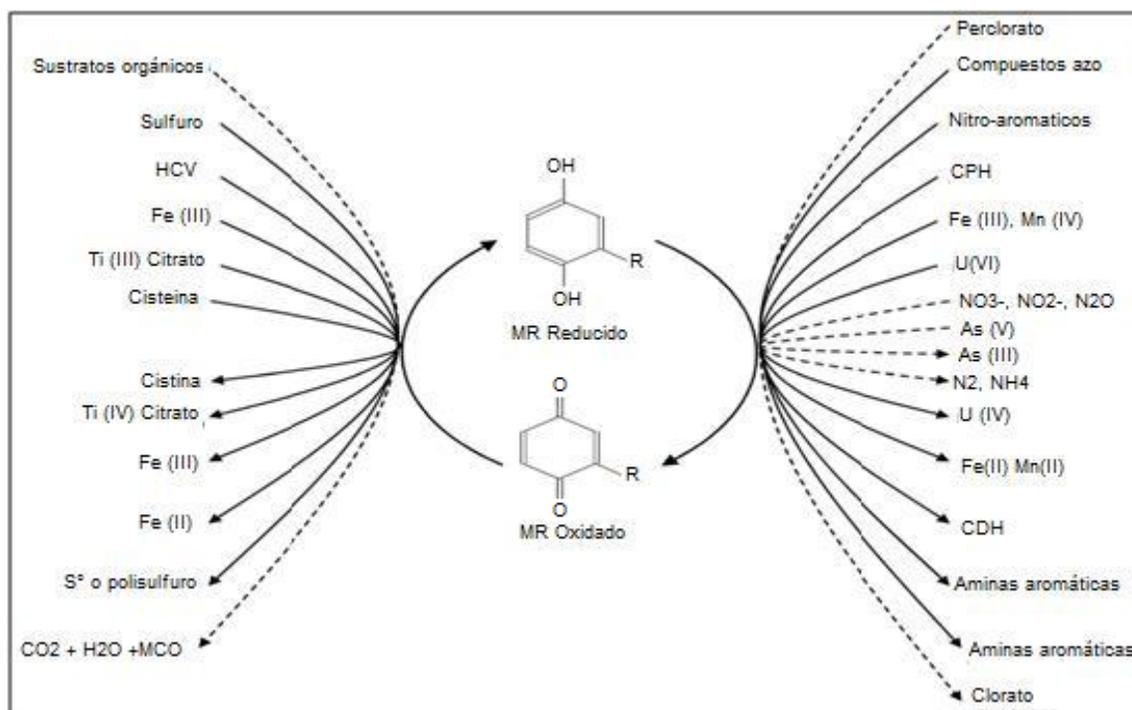
1. Como aceptor final de electrones en la respiración anaerobia microbiana.
2. Como transportadores de electrones que aceleran procesos de redox.
3. Como donadores de electrones para la reducción de aceptores de electrones más oxidados por microorganismos.

En el presente trabajo, se evaluará el efecto de SH como MR, por lo que en la siguiente sección se explicará en términos generales el proceso por el cual aceleran las reacciones de oxido-reducción y se resumirán algunos casos en los cuales éstos han sido utilizados.

### 3.1. MR en procesos de óxido-reducción (redox).

Desde la década de 1990, una gran cantidad de trabajos de investigación se han llevado a cabo con el objeto de explorar los efectos catalíticos de los MR en procesos de bio-transformación. Dichos MR, son moléculas orgánicas capaces de oxidarse y reducirse cíclicamente, lo que les confiere una gran capacidad de servir como transportadores de electrones en múltiples reacciones redox. Los MR aceleran la reacción redox disminuyendo la energía de activación de la reacción global, o bien, en algunos casos su presencia es necesaria para que la reacción se efectúe (van der Zee & Cervantes, 2009).

Los MR más relevantes que favorecen la oxidación microbiana de compuestos orgánicos bajo condiciones anaerobias son las SH y las quinonas (Field y Cervantes, 2005). La reducción microbiana de quinonas puede estar asociada a la oxidación de un gran variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos, promoviendo así la re-oxidación de los MR y a su vez, la reducción de compuestos electrofílicos (van der Zee & Cervantes, 2009). La Figura 3.1 muestra la amplia gama de reacciones de óxido-reducción en las que han estado involucradas las quinonas como MR.



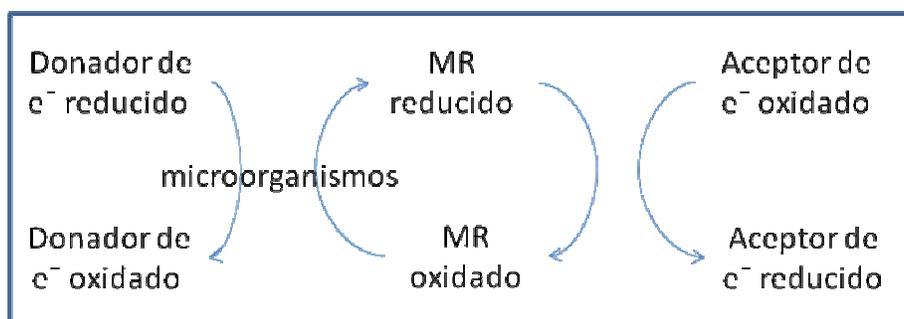
**Figura 3.1** Reacciones abióticas (líneas sólidas) y bióticas (líneas punteadas) involucradas en la oxidación y reducción de mediadores redox, CPH: Contaminantes polihalogenados; CDH: Compuestos deshalogenados HCV: Hierro cero Valente; MR: Mediador Redox (van der Zee & Cervantes, 2009).

Para que un MR pueda ser un transportador de electrones efectivo su potencial redox estándar ( $E^{\circ}$ ) idealmente deberá estar entre los potenciales redox del donador y aceptor último de electrones de la reacción media. No obstante, dado que la eficiencia del MR dependerá de la energía de activación de su reacción de reducción y oxidación, en comparación con la reacción sin MR, puede darse el caso en que incluso compuestos con un  $E^{\circ}$  menor que el donador primario, o mayor que el aceptor terminal de electrones pueda ser un MR efectivo (van der Zee & Cervantes, 2009).

En la mayoría de los estudios en los que se han utilizados los MR involucran la reducción de colorantes azo y compuestos nitro-aromáticos. El efecto observado en estos experimentos fue positivo al incrementar la velocidad y el grado de reducción de estos contaminantes, incluso en algunos casos, la presencia del MR fue un requisito esencial para que se llevara a cabo la reacción. Sin embargo, se

ha presentado raramente que el efecto de éstos fue menor, ausente o inclusive adverso respecto al control sin MR. Lo anterior, se explica debido a la gran cantidad de combinaciones entre las condiciones estudiadas; por ejemplo, aceptor de electrones/MR/cantidad de biomasa (van der Zee & Cervantes, 2009) o bien el tipo de tratamiento en el que hayan sido utilizados: lote, semi-continuo o continuo y los parámetros de operación que éstos incluyen: tiempo de residencia hidráulico (TRH), pH, tipo de reactor etc. (van der Zee & Villaverde, 2005). En las Tablas 3.1 y 3.2 se resume la utilización de algunos MR con diversos colorantes y compuestos nitro-aromáticos, respectivamente.

En términos generales, el mecanismo biótico por el cual actúan los MR involucra: un donador de electrones el cual es oxidado anaeróbicamente por microorganismos, un MR que acepta los electrones de dicha oxidación y los transporta a un aceptor final de electrones el cual es reducido. En la Figura 3.2 se muestra esquemáticamente dicho mecanismo.



**Figura 3.2** Mecanismo general de reacción en la reducción biótica de compuestos electrofílicos en presencia de MR

**Tabla 3.1** Impacto de distintos MR en la bio-transformación de diferentes colorantes azo en sistemas en lote y flujo continuo.

| Colorante Azo   | Sistema                                      | Donador de electrones | MR  | Resultados  | Referencia                   |
|---|--|-----------------------|-----|---|------------------------------|
| Rojo ácido 27, Rojo ácido 1, Amarillo alimento 2, negra ácido 1 | Sepa pura: <i>Sphingomonas xenophaga</i> BN6 | Glucosa               | AQS | Sin MR no hubo reducción. Incremento de 4.5, 2.2 6.6, y 3.3 mM min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> proteína <sup>-1</sup> | Kudlich <i>et al.</i> (1997) |

**Tabla 3.1 (continuación)** Impacto de distintos MR en la bio-transformación de diferentes colorantes azo en sistemas en lote y flujo continuo

| Colorante Azo   | Sistema   | Donador de electrones | MR                        | Resultados  | Referencia                   |
|---|---|-----------------------|---------------------------|---|------------------------------|
| Rojo ácido 27, Naranja ácido 20, Naranja ácido 7, Amarillo alimento 3, Rojo ácido 18, Rojo alimento 17, Rojo ácido 14, Rojo ácido 1, Amarillo ácido 23, Negro ácido 1, Negro alimento 1 | Sepa pura: <i>Sphingomonas xenophaga</i> BN6; <i>Escherichia coli</i> K12 | Glucosa               | AQS, LAW                  | La diferentes combinaciones de colorante, MO y MR arrojaron diferentes resultados.  | Rau <i>et al.</i> (2002)     |
| Rojo ácido 73, Amarillo ácido 36, Naranja ácido 10, Naranja ácido 7, Rojo ácido 26  | Sepa pura: <i>Shewenella decolorationis</i> S12                           | Formiato              | AQS, AQDS                 | ERC en 12 h sin MR de ~19%, AQS 96% con (MR/CA=1) sin efecto mayor con (MR/CA=3) y efecto adverso con (MR/CA=5), para AQDS 1.33 con MR/CA=1; no hubo efecto o efecto adverso con mayores relaciones MR/CA | Hong <i>et al.</i> (2007)    |
| Rojo ácido 27   | Lote: Lodo activado aerobio (bajo condiciones anaerobias)                 | Glucosa               | AQS                       | 0 → 3 μmol min. g proteína conforme aumentó MR. No hubo efecto con una relación MR/CA >~1.2   | Kudlich <i>et al.</i> (1997) |
| Rojo ácido 27   | Lote: Lodo activo aerobio (bajo condiciones anaerobias)                   | Glucosa               | AQS, LAW<br>Hoja de henna | AQS: incremento. 10-15 veces ;<br>LAW: incremento de. 7-12 veces;<br>Hoja de henna: incremento 9 veces  | Rau <i>et al.</i> (2002)     |

**Tabla 3.1 (continuación)** Impacto de distintos MR en la bio-transformación de diferentes colorantes azo en sistemas en lote y flujo continuo

| Colorante Azo               | Sistema   | Donador de electrones              | MR   | Resultados   | Referencia                       |
|-----------------------------|---|------------------------------------|------|--|----------------------------------|
| Naranja reactivo 14         | Lote: Lodo Anaerobio Granular                       | Glucosa                            | RF   | Incremento de 1.5 -2 veces en la tasa de reacción respecto al control sin MR                                       | Cervantes <i>et al.</i> (2006)   |
| Rojo reactivo 2             | Lote: Lodo anaerobio granular                       | AGV                                | AQDS | Incremento máximo 7 veces en la tasa de reacción respecto al control sin MR  | van der Zee <i>et al.</i> (2001) |
| Amarillo mordiente 10       | Lote: Lodo anaerobio granular                       | AGV                                | RF   | Incremento máximo 2 veces en la tasa de reacción respecto al control sin MR  | Field & Brady (2003)             |
| Rojo reactivo 2 hidrolizado | Lote: Lodo Anaerobio granular a diferentes T        | Glucosa<br>AGV                     | AQDS | Con MR 30°C 5 veces a 55°C 1.5 veces. k fue sin MR a 55°C fue 6 veces mayor respecto al control 30°C               | dos Santos <i>et al.</i> (2004)  |
| Naranja reactivo 14         | Lote: Lodo anaerobio granular a 55°C                | Glucosa diferentes concentraciones | RF   | 1.4 a 4.0. el impacto aumentó directamente proporcional al incremento de glucosa                                   | dos Santos <i>et al.</i> (2006)  |
| Naranja ácido 7             | Continuo:UASB con lodo granular anaerobio TRH 2-6 h | AGV                                | AQDS | Remoción de color de 97% respecto al control sin MR 86% con TRH = 6 h. Efecto del MR más evidente disminuyendo TRH | Cervantes <i>et al.</i> (2001)   |

**Tabla 3.1 (continuación)** Impacto de distintos MR en la bio-transformación de diferentes colorantes azo en sistemas en lote y flujo continuo

| Colorante Azo                                    | Sistema   | Donador de electrones       | MR       | Resultados  | Referencia                       |
|--|---|-----------------------------|----------|---|----------------------------------|
| PCNB→PCA   | Fe(II)  | COD de diferentes orígenes, | Abiótico | Cte de 1er orden en la reducción de PCNB. Aumento de 8 veces en presencia de MOD en comparación sin MOD | Hakala <i>et al.</i> (2007)      |
| Rojo Reactivo 2                                  | Continuo:UASB con lodo granular anaerobio TRH 5.9 h                 | AGV                         | AQDS     | ERC aumentó incrementando MR de 48% sin MR a 98% con MR/CA = 0.97                                       | van der Zee <i>et al.</i> (2001) |
| Rojo reactivo 2 hidrolizado, Aguaresidual textil | Continuo:EGSB diferentes T con lodo granular anaerobio TRH 10-2.5 h | AGV                         | AQDS     | Efecto de MR sólo a 30°C, 55°C mejor efecto sobre todas las condiciones                                 | dos Santos <i>et al.</i> (2005)  |
| Naranja ácido 7                                  | SBR   | Almidón                     | MD, AQDS | ERC aumentó de 5 % (sin MR) a 25% MD y 70 y 90% con AQDS MR/CA= 0.7 y 1.4 respec.                       | Albuquerque <i>et al.</i> (2005) |

AGV: Ácidos grasos volátiles; AQDS: 2, 6 Antraquinona disulfonato; AQS Antraquinona 2 sulfonato; CNB12: Cianocobalamina (Vitamina B12); CA: Colorante Azo; EGSB: Reactor de flujo ascendente de lecho expandido, por sus siglas en inglés; ERC: Eficiencia remoción de color; LAW : Lausona por su nombre en inglés; MD: Mediadona; MR: Mediador Redox; NQS: Naftoquinona sulfonato; respec: respectivamente; RF: Riboflavina; SBR: Reactor secuencial en lote, por sus siglas en inglés y UASB: Rector Anaerobio de Flujo Ascendente, (por sus siglas en inglés).

**Tabla 3.2** Efecto de MR sobre la transformación de diferentes compuestos nitro-aromáticos bajo condiciones abióticas y bióticas

| Reactivo→ producto         | Donador de electrones | MR               | Tipo de proceso | Resultados  | Referencia                           |
|----------------------------|-----------------------|------------------|-----------------|---|--------------------------------------|
| Nitro-aromáticos →Anilinas | Sulfuro o cisteína    | JUG, LAW o HPF   | Abiótico        | Cte de transformación. de 2do orden entre $3 \times 10^{-3}$ y $3.3 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ con MR. No existió reducción significativa sin MR | Schwarzenbach <i>et al.</i> , (1990) |
| Nitro-aromáticos →Anilinas | Sulfuro               | Materia orgánica | Abiótico        | Cte de transformación de 2do orden entre $3 \times 10^{-6}$ y $3.3 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ con MO. No existió reducción significativa sin MO                 | Dunnivant <i>et al.</i> , (1992)     |

**Tabla 3.2 (Continuación)** Efecto de MR sobre la transformación de diferentes compuestos nitro-aromáticos bajo condiciones abióticas y bióticas

| Reactivo → producto          | Donador de electrones | MR                   | Tipo de proceso  | Resultados  | Referencia                      |
|------------------------------|-----------------------|----------------------|--|---|---------------------------------|
| Dinitroanilinas → anilinas   | HCV                   | Ácidos húmicos o DCN | Abiótico   | AH aumentaron reducción de 1.2 a 10 veces. DCN careció de efecto comparado con el control sin MR  | Keum & Li, (2004)               |
| Nitro-aromáticos → Anilinas  | Sulfuro               | JUG                  | Abiótico   | Cte de 2do orden en la reducción de nitro-aromáticos entre $2.3 \times 10^{-3}$ y $6.9 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ con Jug. No existió efecto sin JUG | Hofstetter <i>et al.</i> (1999) |
| NB → Anilina                 | HCV                   | AF, AQDS o LAU       | Abiótico   | Hasta 20% de decremento en la reducción de NB presencia AF, mientras se aumentó 1.2 y 1.5 en presencia de LAW y AQDS  | Tratnyek <i>et al.</i> (2001)   |
| TNT → 2,4 DHANT y PNI        | Sacarosa              | AQDS                 | Biótico: <i>cellulomonas</i> sp. Sepa ES6  | Hasta 3.7 veces se aumentó la reducción comparara con los controles sin AQDS  | Borch <i>et al.</i> (2006)      |
| RDX o HMX → varios productos | Glucosa               | AH o AQDS            | Biótico: <i>Clostridium</i> sp EDB2  | Remoción completa de RDX con AQDS y AH con 5 y 8 días. En comparación de 10 sin MR  | Bhushan <i>et al.</i> , (2006)  |
| RDX → TNX                    | Acetato-OHCP          | AH o AQDS            | Biótico: <i>Geobacter metallireducens</i> Sepa GS-15 o <i>Geobacter metallireducens</i> Sepa PCA | HA y AQDS en presencia de microorganismos aumentaron de 5 a 66 veces la tasa de reducción comparado con controles sin MR  | Kwon and Finneran (2006)        |
| RDX → Varios productos       | Acetato               | AQDS                 | Biótico: <i>Geobacter metallireducens</i>  | AQDS aumentó la tasa y grado de mineralización  | Kwon and Finneran (2008)        |

#### 4. Inmovilización de sustancias húmicas

Las técnicas de inmovilización han sido de mucha utilidad para la investigación de estructuras protéicas, ácidos nucleicos y otras macromoléculas; sin embargo, su aplicación en humus no ha sido explorada ampliamente, aun cuando la inmovilización puede implicar múltiples aplicaciones, entre las que se encuentran la adsorción de compuestos orgánicos e inorgánicos (Klavins & Apsite, 1997) y su aplicación como MR en reactores de tratamiento de aguas residuales (Ceballos 2005).

En el estudio realizado por Klavins y Apsite (1997) se reporta que los grupos hidroxilo del humus reaccionan con grupos epoxi (de matrices de celulosa o epoxi-propi-sílica), en un medio alcalino, dando como resultado una alta cantidad de humus inmovilizado. Sin embargo, en las quinonas, los grupos funcionales de interés para la transferencia de electrones, son precisamente los grupos hidroxilo, por lo que el método anterior podría disminuir o eliminar totalmente el grado de actividad catalítica de las quinonas. Por otra parte, en el trabajo realizado por Shoba *et al.* (2005) se fijó un nanotubo de carbón activado, de pared sencilla, a un dispositivo electroquímico, a partir de la reacción de sus grupos funcionales con el dispositivo antes mencionado. Una vez fijo el nanotubo, se inmovilizaron los MR toluidina y tionina, con el fin de fabricar un sensor químico y amperométrico en la reducción de peróxido de hidrógeno; sin embargo, no se reportó el uso de esta metodología para SH o quinonas.

Guo *et al.* (2007) realizaron un estudio para determinar la capacidad de reducción de colorantes con el uso de bacterias halofílicas y un tipo no especificado de antraquinona (AQ) como MR, inmovilizada en diferentes medios como alginato de calcio, poli (alcohol vinílico), ácido bórico y agar. El alginato de calcio con AQ inmovilizada fue el medio donde se obtuvo un incremento de 1.5 a 2 veces en la eliminación del colorante en comparación con el control sin AQ. No obstante, los estudios especificados en la Tabla 3.2 mostraron una acción del MR igual o mejor

en forma soluble (van der Zee *et al.*, 2001; Rau *et al.*, 2002; Field & Brady, 2003; Cervantes *et al.*, 2006; dos Santos *et al.*, 2004).

En otros estudios, Ceballos (2005) realizó por primera vez la inmovilización de antraquinona disulfonato (AQDS) en carbón activado con el fin de aplicar este MR en la reducción biológica de colorantes azo. En este estudio se observó que la máxima capacidad de adsorción fue de aproximadamente 1500 mg AQDS/g carbón activado, lo cual indica una muy alta afinidad del carbón activado por la AQDS. Así mismo, se evaluó la capacidad de la AQDS inmovilizada para transformar un colorante azo en lote, lo cual dio como resultado un incremento de 2.4 veces la tasa de decoloración respecto al control que estaba libre de AQDS inmovilizada.

Por otra parte, van der Zee *et al.* (2001) exploraron la capacidad del carbón activado, como MR, en la transformación del colorante RR2 en un reactor UASB. En este estudio se demostró que la incorporación de carbón activado al lecho de lodos, incrementó la decoloración de RR2 después de 130 d de operación. El reactor incubado con carbón activado removió 5.895 g de RR2, mientras que el control sin carbón activado, 2.385 g de RR2, es decir el reactor con carbón activado convirtió 3.51 g de RR2 más que el control. De la cantidad total de colorante removido, sólo 0.1572 g se atribuyó a la adsorción de mismo en el carbón activado, mientras que el restante se imputó a la reducción promovida por el carbón activado al actuar como MR.

En este mismo contexto, Mezohegyi *et al.* (2007) estudiaron la capacidad de reducción del colorante naranja ácido 7 (NA7) en un reactor empacado de flujo ascendente con carbón activado biológico (UABR-BAC). Los resultados de este estudio mostraron que ocurrió una decoloración del 95% en un tiempo de residencia espacial (TRE) de 1.6 min y de un 99% en un TRE de 2 min. Estos valores son equivalentes a 4.4 y 5.5 min de TRH, respectivamente. Considerando dichos TRH, Mezohegyi *et al.* (2007) mostraron que el uso de un reactor de lecho

empacado con carbón activado para la decoloración de NA7 es una alternativa interesante para dar tratamiento a los colorantes azo.

Considerando la importancia de llevar a cabo la inmovilización de SH, Cervantes *et al.* (2003) lograron establecer un comunidad de bacterias reductoras de quinonas en un lodo granular anaerobio, donde se destaca que una de las principales aplicaciones puede darse en la bio-transformación de contaminantes prioritarios en reactores anaerobios. Lo anterior, indica que es posible inmovilizar baterías reductoras de quinonas y, al combinarse con una técnica de inmovilización de los MR, significaría una buena opción para el tratamiento de aguas residuales industriales.

Más recientemente, García (2008) realizó la inmovilización de AQDS y NQS sobre resina de intercambio iónico con el fin de probar la capacidad catalítica de dichos MR inmovilizados en la bio-transformación reductiva del colorante RR2. En este trabajo se inmovilizaron 1.72 mili-equivalentes (meq) AQDS/g de resina esférica y 1.42 meq NQS/g resina esférica; así mismo, ambas quinonas se inmovilizaron en una resina fibrosa y se obtuvo una cantidad inmovilizada de 3.12 meq AQDS /g de resina fibrosa y 2 meq NQS /g de resina fibrosa. Este trabajo es de particular relevancia ya que los MR inmovilizados no perdieron su capacidad catalítica, siendo la NQS inmovilizada en resina esférica la que mostró un incremento de 6.5 veces en la tasa de decoloración respecto al control biológico sin quinona. Los resultados reportados por García (2008) indican que la resina de intercambio iónico pueden desempeñarse como un excelente soporte para los MR modelo NQS y AQDS, lo que podría tener un gran impacto en el tratamiento en flujo continuo de efluentes con colorantes azo.

Finalmente, Yang *et al.* (2009) realizaron la adsorción de SH en partículas nanométricas de diferentes óxidos. En este estudio se utilizó turba y se evaluó su interacción con partículas nanométricas de  $\text{TiO}_2$ ,  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{ZnO}$  y  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  para adsorber ácido húmico proveniente de turba y se obtuvo una adsorción 92, 80, 20

y 4 mg/g, respectivamente, a pH 5. Cabe mencionar que en dicho trabajo no se utilizó a las SH inmovilizadas en la reducción de un contaminante por lo que es de interés evaluar la capacidad reductora de las SH inmovilizadas con esta metodología.

## 5. Justificación

A pesar de los múltiples trabajos que se han realizado recientemente para estudiar a las SH en su papel como MR, de los cuales se ha obtenido información relevante sobre la ventaja que éstas ofrecen al aumentar la velocidad de transformación de una amplia variedad de contaminantes (Dunnivant, 1992 Curtis G. *et al*, 1994; Perlinger J. A. *et al.*, 1996; Cervantes 2001; van der Zee 2002) su empleo a nivel mundial ha sido muy limitado. Si bien es cierto las concentraciones a las cuales se adicionan los MR son bajas, una de las razones de su escasa aplicación es consecuencia del alto costo que implica la dosificación permanente de dichos catalizadores en sistemas de tratamiento continuo.

Derivado de lo anterior, la demanda de sistemas de tratamiento de aguas que contemplen la adición de MR es muy escasa en el mercado; por lo que una estrategia interesante que permitiría utilizar los MR de manera continua, sin necesidad de adicionarlos de manera permanente, es inmovilizándolos en un soporte que permita mantenerlos en los sistemas de tratamiento de aguas residuales (Ceballos *et al*, 2005; Mezohegyi, 2007). Como respuesta al interés por inmovilizar MR y seguir aprovechando sus propiedades catalíticas en el tratamiento de contaminantes prioritarios, se han desarrollado estudios sobre procesos de inmovilización de diferentes quinonas para su aplicación en el tratamiento continuo de colorantes azo utilizando soportes adsorbentes (Ceballos, 2005), a través del manejo de materiales funcionalizados naturalmente con grupos quinona (van der Zee *et al* 2003), fijando una comunidad bacteriana sobre un soporte (Mezohegyi *et al.* 2007) y más recientemente, fijando MR sobre resina de intercambio iónico (García, 2008).

A pesar de que los estudios arriba mencionados han logrado un avance para resolver la problemática de la pérdida de MR en el tratamiento de efluentes, aún existen limitantes como: encontrar materiales adecuados para aumentar la

cantidad de MR inmovilizado, utilizar contaminantes más recalcitrantes en los estudios, probar diferentes regímenes bajo flujo continuo, y particularmente es que en todos los estudios se ha trabajado sólo con colorantes azo y únicamente se han inmovilizado MR modelo. Debido a lo anterior, es necesario diversificar el tipo de contaminante con el cual se evalúan las propiedades catalíticas de los MR inmovilizados e igualmente desarrollar estudios que inicien pruebas con sustancias húmicas parentales ya que esto permitiría reducir aún más el costo del tratamiento del efluente.

## 6. Objetivos e hipótesis

### 6.1. Objetivo general

Evaluar el efecto catalítico de SH inmovilizadas, en una resina de intercambio iónico, durante la reducción de contaminantes nitrogenados aromáticos por un consorcio anaerobio.

### 6.2. Objetivos particulares

- Evaluar la capacidad de intercambio de una SH por Cl<sup>-</sup> de una resina de intercambio iónico, por medio de isothermas de adsorción.
- Evaluar la actividad catalítica de SH inmovilizadas, en una resina de intercambio iónico, durante la reducción de 4NF por un consorcio anaerobio.
- Evaluar la actividad catalítica de SH inmovilizadas, en una resina de intercambio iónico, durante la reducción de RR2 por un consorcio anaerobio.

### 6.3. Hipótesis

La adsorción de SH en una resina de intercambio iónico permitirá inmovilizarlas y conservar su capacidad de transferencia de electrones, lo cual se reflejará en un aumento de eficiencia de bio-transformación de compuestos nitrogenados aromáticos por un consorcio anaerobio.

## 7 Materiales y métodos

### 7.1 Activación y estabilización de biomasa

La biomasa activada fue un lodo granular metanogénico, proveniente de la planta de tratamiento de aguas residuales de Central de Malta, Lara-Grajales, Puebla. La cantidad de lodo activado y estabilizado fue de aproximadamente 600 mL y se depositó en un reactor UASB con una capacidad de 1.3L. La temperatura de operación fue de aproximadamente 25°C, y los parámetros medidos para observar su eficiencia fueron: eliminación de materia orgánica, medida como demanda química de oxígeno (DQO) por el método micrométrico de UV visible, monitoreo del valor de pH con un potenciómetro marca Termo Scientific modelo Orion 5 star y cuantificación de producción de gas metano a través del desplazamiento de una solución de NaOH (5%) contenida en una columna de 250 mL utilizando fenoftaleina como indicador de la reactividad del NaOH.

La biomasa depositada en el reactor UASB fue alimentada por una bomba peristáltica marca Masterflex modelo 7720160 con un medio que contenía 1.5 g DQO/L utilizando dextrosa anhidra como sustrato, con un TRH de 12 hrs, utilizando un medio basal con la siguiente composición (mg/L):  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (280),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (250),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (100),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (10) y 1 ml/L de los siguientes elementos traza (mg/l):  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (2000);  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (50);  $\text{ZnCl}_2$  (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 %). El muestreo para determinar eliminación de DQO y pH se realizó cada tercer día.

### 7.2 Selección de sustancias húmicas

En el presente estudio se utilizó leonardita (lignita oxidada naturalmente) como fuente de ácidos húmicos, la cual mostró tener una alta capacidad de transferencia de electrones en el estudio de Lovley *et al.* (1996). Dicha SH fue adquirida a través de la Sociedad Internacional de Sustancias Húmicas (IHSS) y

fue utilizada sin previa purificación. La composición elemental de la leonardita parental determinada por la IHSS es: C= 49.2, H=4.52 y N= 0.9 (oxígeno no determinado).

### 7.3 Sulfonación de leonardita

En el trabajo presentado por Yudov *et al.* (2005) en el que se evaluó el efecto de la sulfonación sobre la solubilidad, la formación de sitios ácidos y de sitios de enlace fuerte en leonardita; se encontró, en los tres parámetros, un efecto positivo cuando se añadió el grupo  $\text{SO}_3^-$  mediante la sulfonación. Con este mismo propósito, en el presente trabajo, se realizó la sulfonación de leonardita para aumentar el grado de solubilidad y el número de grupos funcionales  $\text{SO}_3^-$  disponibles para el intercambio iónico.

La sulfonación se realizó por el método reportado por Yudov *et al.* (2005). Se pesó una determinada cantidad de SH y se secó por 24 horas a no más de 65°C. Posteriormente, se añadió lentamente 2 ml de ácido cloro-sulfónico ( $\text{HClSO}_3$ ), marca Sigma-Aldrich con un grado de pureza de 99%, previamente enfriado, por cada g de leonardita y se mezcló durante 6 horas en un matraz sumergido en hielo, con el propósito de evitar la pérdida del ácido por volatilización. Una vez terminado el mezclado, se vertió en un volumen de agua destilada congelada 20 veces mayor que el  $\text{HClSO}_3$  añadido y se dejó reposar por 15 horas.

A continuación, la mezcla se centrifugó a 8000 rpm repetidas veces hasta no poder separar el sobrenadante del precipitado. Finalmente, la muestra fue dializada en membranas con un tamaño de poro de 1000 Daltons (marca Spectra/Por modelo MWCO: 1000) en agua destilada fría con un volumen 20 veces mayor que el de la muestra empacada, sustituyendo dicho volumen diariamente durante 10 días. Para determinar la cantidad de grupos sulfonato añadidos a leonardita se realizaron pruebas de energía de difracción de rayos X (EDX) y se contabilizó al C, O, N, S e igualmente se tomaron micrografías de la SH modificada y del control para observar los cambios morfológicos de las SH con un microscopio electrónico de barrido marca Phillips, modelo FEG-XL30. Así

mismo, se realizó un análisis infrarrojo para comprobar la pérdida o ganancia de grupos funcionales en la leonardita tanto sulfonadas como no sulfonadas.

#### 7.4 Selección de resina

La selección de la resina (Amberjet 4600 Rohm and Haas cuya matriz es un copolímero de divinil-bencen-estireno y su grupo funcional es una amina cuaternaria tipo II.) se seleccionó tomando en cuenta los resultados obtenidos por García (2008) donde mostró que la resina esférica Amberjet tuvo una capacidad de adsorción de 1.72 y 1.42 meq de AQDS y NQS por g resina, respectivamente. Así mismo, esta resina se conservó en el fondo de la botella serológica en el tratamiento en lote, haciendo de esta resina la más factible para utilizarla expuesta a un flujo ascendente durante el tratamiento continuo.

#### 7.2 Experimentos de solubilidad

##### 7.2.1 Pruebas de solubilidad de leonardita

Las pruebas de solubilidad fueron realizadas a leonardita sulfonada (LS) y leonardita sin sulfonar o control (LC) para evaluar el efecto de la sulfonación en dicho parámetro. Para tal efecto, se realizó un diseño factorial utilizando el software Minitab versión 14.1.0.0 para probar el efecto del pH, la concentración de SH y el efecto de la sulfonación en LC y LS. Para tal experimento, se probaron todas las combinaciones posibles con los valores de pH 7 y 10, el tratamiento a la leonardita: sulfonada o no sulfonada y diferentes concentraciones (2, 7, 16 g/L) para después analizar la concentración, en términos de COT disuelto, de leonardita que fue posible solubilizar. Para realizar la solución se utilizó un volumen de trabajo de 20 mL, el ajuste de pH se realizó inicialmente con una solución 0.2 M de NaOH (J.T. Baker solución volumétrica) y se agitó a 180 rpm a 28 °C por 24 hrs con un agitador orbital marca ESEVE modelo INO 65V-7. Una vez terminado el tiempo de agitación se tomó una muestra del sobrenadante y centrifugó por 10 min a 13,000 rpm con una centrifuga marca Labnet modelo 24D. Consecutivamente, se tomó una muestra de 1 mL del sobrenadante, se diluyó 20 veces con agua destilada y se filtró con una membrana con tamaño de poro de

0.22  $\mu\text{m}$  marca micropore y se analizó el contenido de COT disuelto con un analizador de Carbón Orgánico Total marca Shimadzu modelo TOC-Vcsh NC.

### 7.2.2 Optimización de las condiciones de LS por el diseño de superficie de respuesta

Una vez obtenidas los resultados en las pruebas de solubilidad y observando que la sulfonación tuvo un efecto positivo sobre la solubilidad de las SH y concordó con lo reportado con Yudov *et al.* (2005), se procedió a realizar un diseño experimental, utilizando la metodología de superficie de respuesta, para encontrar las condiciones óptimas de solubilidad, utilizando como variable de respuesta el COT disuelto. Para tal prueba, se eligió un intervalo de pH de 10 a 11 y una concentración inicial de 16 y 18 g SH/L, por lo que se utilizaron 5 puntos centrales, 4 puntos dentro del intervalo de pH y el intervalo de concentración inicial de SH y por último 4 puntos fuera de dicho intervalo de pH y concentración inicial de SH. Los parámetros de tiempo de agitación, ajuste de pH, concentración de NaOH y procedimiento para la toma de muestras fueron exactamente los utilizados en las pruebas de solubilidad. Una vez que se obtuvieron los resultados de la optimización se realizó un experimento con una concentración inicial y un pH dentro del intervalo para corroborar que los resultados obtenidos por el método fueran reproducibles.

### 7.3 Relación masa volumen, cinética de adsorción e isothermas de adsorción

Debido a que se corroboró que el proceso de sulfonación de la leonardita incrementaba su solubilidad, lo cual fue previamente reportado por Yudov *et al.* (2005), se procedió para fines prácticos a utilizar para todos los experimentos posteriores a la leonardita sulfonada.

#### 7.3.1 Relación masa volumen (m/V)

Este experimento se realizó para encontrar las condiciones óptimas bajo las cuales se adsorbiera mayor cantidad de COT disuelto en la resina de intercambio

iónico. En dicho experimento se probaron diferentes valores de la relación m/V (masa resina/volumen de SH) por duplicado desde 0.00025 hasta 0.100 g/mL. El experimento se llevó a cabo a 28°C a 180 rpm con un tiempo de contacto de 24 horas. La solución de SH se preparó bajo las condiciones encontradas en los experimentos de optimización de solubilidad, siendo su concentración aproximada 5800 ppm de COT disuelto, para después realizar una dilución para obtener un valor de 1000 ppm de COT disuelto y ser ajustada posteriormente a un pH inicial de  $7.0 \pm 0.1$ . Los análisis de COT disuelto realizados a la solución, mostraron que la concentración inicial experimental fue de  $996.1 \pm 4$  ppm de COT disuelto.

### 7.3.2 Cinética de adsorción.

La cinética de adsorción se llevó a cabo utilizando una relación m/V de .020 g/mL, utilizando un volumen de trabajo de 2.5 mL en muestras sacrificables. La concentración inicial experimental fue de 996.1 ppm de COT disuelto ajustada a un pH de  $7.0 \pm 0.1$ . Los tiempos de muestreo fueron a 1, 3, 9, 12, 24, 48, 70 horas, en cada tiempo de muestreo se tomó 1 mL de la solución en equilibrio, se almacenó y se analizó COT disuelto en el equilibrio.

### 7.3.3 Isotermas de adsorción

Una vez observado el tiempo necesario para establecer el equilibrio se procedió a realizar las isotermas de adsorción de LS en resina Amberjet. Las concentraciones iniciales de LS soluble en forma de COT disuelto fueron: 250, 500, 750, 1000, 2000, 3500, 5000, 6000 y 6500 mg/L. Las isotermas de adsorción se llevaron a cabo utilizando una relación m/V de 0.020 g/mL, utilizando un volumen de trabajo de 2.5 mL y un tiempo de equilibrio de 24 h.

## 7.4 Pruebas de desorción

Para constatar la robustez con la que la LS se adsorbió en la resina se realizó un ciclo de desorción, con el medio mineral utilizado para la activación de la biomasa (sin glucosa). Antes de iniciar cada ciclo, la resina se lavó con agua desionizada y con medio basal. La relación m/V utilizada fue de 0.020 g/mL, se ajustó el pH

inicial a un valor de  $7 \pm 0.1$ . Para evaluar el grado de desorción de a LS de la resina se hicieron mediciones de COT disuelto en el equilibrio. Finalmente, a la resina cubierta con LS se le realizó un análisis por espectroscopía infrarrojo para comprobar la ganancia o pérdida de diferentes grupos funcionales.

7.5 Experimentos en lote de bio-transformación de RR2 en presencia de LS disuelta y adsorbida en resina Amberjet y de 4NF en presencia de LS adsorbida en resina Amberjet

Para comprobar la actividad catalítica de la LS inmovilizada, se realizaron pruebas en lote en la bio-transformación de un compuesto nitro-aromático (4NF) y un colorante azo (RR2). Los datos obtenidos de las cinéticas de transformación reductiva fueron ajustados a los modelos de cero, primer y segundo orden con las siguientes ecuaciones (Fogler, 2001):

Cero orden:

$$C_A - C_{A_0} = -kt \quad \text{Ecuación 7.1}$$

Primer orden

$$\frac{\ln C_A}{C_0} = -kt \quad \text{Ecuación 7.2}$$

Segundo orden

$$\frac{1}{C_A} - \frac{1}{C_{A_0}} = kt \quad \text{Ecuación 7.2}$$

Donde:

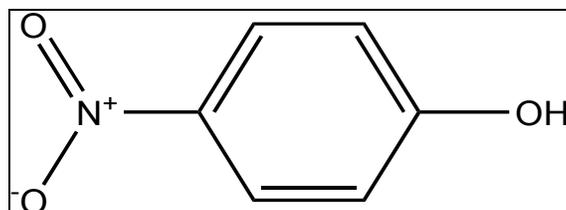
$C_{A_0}$  = Concentración inicial del contaminante (mmol/L)

$C_A$  = Concentración en el tiempo (t) del contaminante (mmol/L)

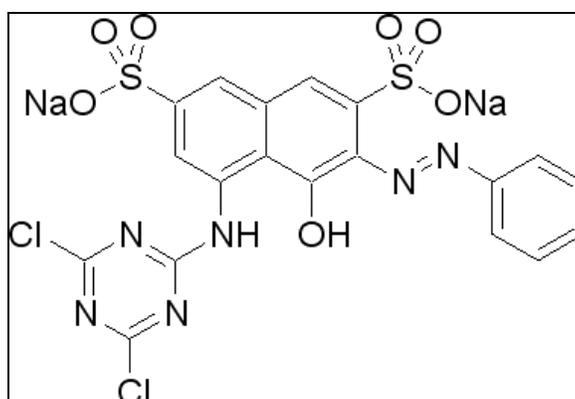
K = Constante de transformación o decoloración

t = tiempo (h)

Las estructuras de los 4NF y RR2 se muestran en la Figura 7.1 y 7.2 respectivamente.



**Figura 7.1** Estructura de 4-nitrofenol



**Figura 7.2** Estructura de rojo reactivo 2

#### 7.5.1 Experimentos de bio-transformación de 4NF

Para llevar a cabo el experimento de bio-transformación de 4NF, se realizaron pruebas por triplicado en botellas serológicas de los siguientes tratamientos:

- A: Contaminante + LS inmovilizada (50 mg COT-Inmovilizado/L) + 0.1 g SSV /L de lodo metanogénico (LM).
- B: Contaminante + LS inmovilizada (25 mg COT-I/L) + 0.1 g SSV /L de LM.
- C: Contaminante + LS inmovilizada (50 mg COT-I /L) (Control estéril).
- D: Contaminante + 0.1 g de SSV/ L de LM (control biológico) para comparar con el tratamiento A.
- E: Contaminante + 0.1g de SSV/L de LM (control biológico) para comparar con el tratamiento B.

Los tratamientos A, B y C, con LS inmovilizada fueron previamente puestos en contacto con una concentración de 1.2 mM de 4NF durante 30 horas con el fin de que se saturaran de contaminante y dejaran en el equilibrio la concentración del contaminante la cual sería eliminada a través de un proceso meramente biológico y no fisicoquímico. Al pasar las 30 horas, a los tratamientos A, B, D, E, se les inyectó un pulso de glucosa (2 g DQO /L) y 0.1 g SSV /L de LM. Los experimentos fueron realizados en botellas serológicas de 120 mL, utilizando 50 mL como volumen de trabajo.

Todos los tratamientos contenían el medio basal utilizado en el proceso de activación y estabilización de biomasa exceptuando el bicarbonato de sodio el cual se agregó en este experimento en una concentración de 5 g/L. Las condiciones anaerobias, en las botellas, fueron inducidas a través del cambio de atmósfera por cinco minutos con la mezcla de nitrógeno/dióxido de carbono: 80/20. Los experimentos se mantuvieron a pH 7.0 mediante el sistema buffer  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ , con una temperatura de 28 °C en agitación constante de 180 rpm mediante un agitador orbital marca ESEVE modelo INO 65V-7. Para evaluar la eficiencia de remoción del contaminante se midió la desaparición de 4NF en diferentes tiempos a una longitud de onda de 400 nm, diluyendo las muestras en buffer de fosfatos 1M como se indica en van der Zee (2002). Finalmente, para rectificar la transformación reductiva de 4NF se realizó un barrido espectrofotométrico de 190 a 600 nm en el último muestreo de la cinética.

#### 7.5.2 Experimentos de bio-transformación de RR2

Para llevar a cabo el experimento de RR2 se realizaron pruebas por triplicado en botellas serológicas de los siguientes tratamientos:

- A: Contaminante + 100 mg COT-I/L + 0.1 g SSV/L de LM
- B: Contaminante + 50 mg COT-I/L + 0.1 g SSV /L de LM
- C: Contaminante + 25 mg COT-I/L + 0.1 g SSV /L de LM
- D: Contaminante + 100 mg COT-I/L (Control estéril)

- E: Contaminantes + 50 mg COT-I /L (Control estéril)
- F: Contaminantes + 0.1 g de SSV/ L de LM (control biológico) para comparar con el tratamiento A
- G: Contaminante + 0.1g de SSV/L de LM (control biológico) para comparar con el tratamiento B y C
- H: Contaminante + 100 mg COT-Disuelto/L + 0.1 g SSV/L de LM
- I: Contaminante + 50 mg COT-D/L + 0.1 g SSV/L de LM
- J: Contaminante + 25 mg COT-D/L + 0.1 g SSV/L de LM
- K: Contaminante + 100 mg COT-D/L

Los tratamientos A, B, C, D y E conteniendo SH inmovilizadas (22 mg COT / g resina), fueron previamente puestos en contacto, durante 30 horas, con una concentración de 0.6 mM (B, C y E) o 1.0 mM de RR2 (A y D), con el fin de que adsorbieran el contaminante hasta su saturación y dejaran en el equilibrio la concentración del contaminante la cual sería eliminada a través de un proceso meramente biológico y no fisicoquímico. A todos los tratamientos, a excepción de los controles estériles, se les inyectó un pulso de 2 g DQO /L (en forma de glucosa) y 0.1 g SSV /L de LM. Los experimentos fueron realizados en botellas serológicas de 120 mL, utilizando 50 mL como volumen de trabajo.

Todos los tratamientos contenían el medio basal utilizado en el proceso de activación y estabilización de biomasa exceptuando el bicarbonato de sodio el cual se agregó en este experimento en una concentración de 5 g/L. Las condiciones anaerobias, en las botellas, fueron inducidas a través del cambio de atmósfera por cinco minutos con la mezcla de nitrógeno/dióxido de carbono: 80/20. Los experimentos se mantuvieron a pH 7.0 mediante el sistema buffer  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ , con una temperatura de 28 °C en agitación constante de 180 rpm mediante un agitador orbital marca ESEVE modelo INO 65V-7.

Para evaluar la eficiencia de remoción del contaminante se midió la desaparición de RR2 en diferentes tiempos a una longitud de onda de 539 nm diluyendo las

muestras en buffer de fosfatos 1M como se indica en van der Zee (2002). Finalmente, para verificar la transformación reductiva de RR2 se realizó un barrido de las muestras en el último muestreo de la cinética, un análisis infrarrojo y de difracción de rayos X a la resina cubierta de SH en los diferentes ensayos.

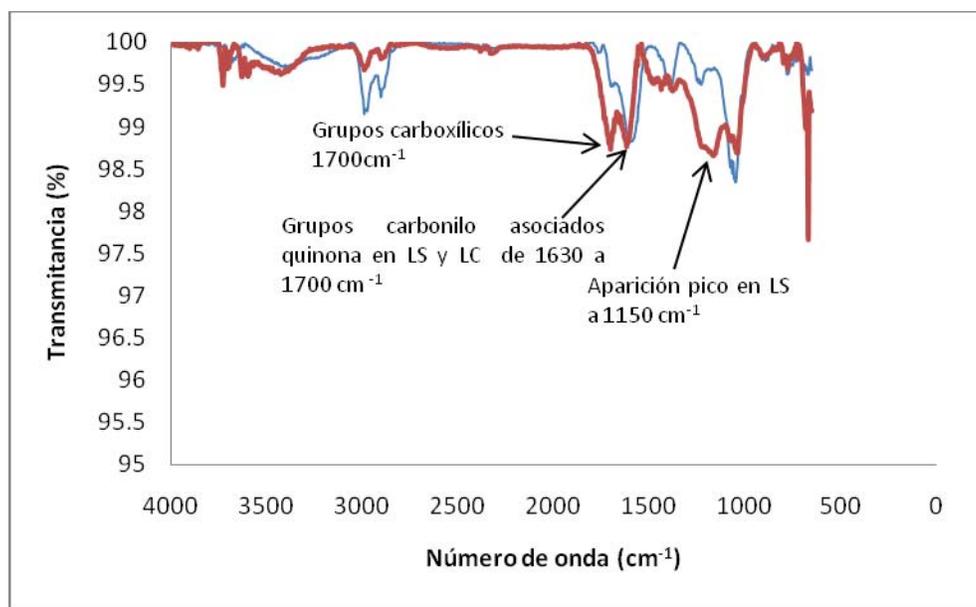
## 8 Resultados

### 8.1 Activación de biomasa

La eficiencia de remoción de DQO que logró el reactor UASB durante los 300 días de activación y estabilización de la biomasa fue superior al 80%. Por otro lado, el pH se mantuvo con un valor promedio de  $7.3 \pm 0.45$ . Lo anterior indica que el reactor se mantuvo en el intervalo en el cual las bacterias metanogénicas pueden desarrollarse y desempeñarse con mayor eficiencia (Rittmann & McCarty, 2001). Por otro lado, la producción de biogás fue de 0.9 a 1.1 L de metano por día lo cual es otro indicador de la actividad metanogénica del lodo granular.

### 8.2 Sulfonación de leonardita

Los resultados del análisis de EDX muestran que leonardita obtuvo una ganancia de azufre de 1.1 puntos porcentuales cuando se le realizó la sulfonación, respecto al control sin modificación. El espectro infrarrojo realizado a LS y LC se muestra en la Figura 8.1.



**Figura 8.1** Espectro infrarrojo de LS y LC

El espectro infrarrojo de la muestra de leonardita sulfonada presenta la aparición de la banda de 1200 a 1050  $\text{cm}^{-1}$ . Silverstain y Webster (1997) definen dos bandas fuertes para los enlaces sulfonato ( $\text{R-SO}_3^{-2}$ ), la primera aparece de 1100 a 1200  $\text{cm}^{-1}$  y la segunda de 1300 a 1450  $\text{cm}^{-1}$ , por lo que es una evidencia de la incorporación de los grupos sulfonato a la leonardita.

A través de este espectro también es posible observar los grupos funcionales de la LS y LC que contienen carbonilo, dichos grupos presentan una banda fuerte de 1630 a 1700  $\text{cm}^{-1}$  y una banda débil alrededor de 1400  $\text{cm}^{-1}$  ambas bandas visibles tanto en el espectro de LS como de LC (Silverstain y Webster 1997). Si bien es cierto, dichos grupos funcionales pueden estar presentes en diversas moléculas, en este estudio, la presencia de éstos puede ser atribuida a grupos quinona. Otro aspecto de interés, se muestra en leonardita sulfonada debido a la aparición de un pico en 1700  $\text{cm}^{-1}$ , mismo que es asociado a grupos COOH en cadenas alifáticas y/o aromáticas, en comparación de leonardita control que no lo presenta.

### 8.3 Solubilidad de sustancias húmicas

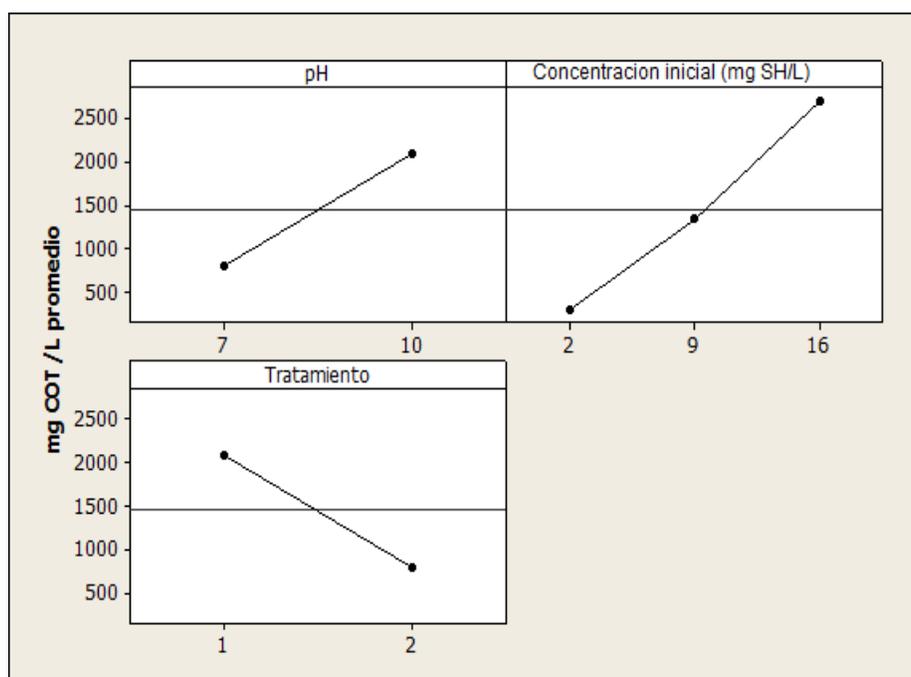
#### 8.3.1 Efecto de la sulfonación, pH, y concentración de SH en la solubilidad de las SH utilizando COT disuelto como variable de respuesta

Las pruebas de solubilidad de leonardita control y leonardita sulfonada fueron realizadas con el objetivo de analizar el efecto de la sulfonación, el pH y la concentración de SH en el incremento de la concentración de COT disuelto. La Tabla 8.1 muestra los resultados obtenidos por el análisis de COT disuelto para los diferentes tratamientos de pH y concentración inicial de SH. Se observa que se incrementa la concentración de COT disuelto en todos los casos en que se utiliza el mismo pH y cantidad de SH comparando LS con LC. De igual forma, el valor de pH 10 incrementó el valor de COT disuelto utilizando la misma sustancia húmica.

**Tabla 8.1** Análisis de COT disuelto a SH con distintos tratamientos

| Concentración inicial de SH (g /L) | LS             |                 | LC             |                 |
|------------------------------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
|                                    | pH 7 mg COT /L | pH 10 mg COT /L | pH 7 mg COT /L | pH 10 mg COT /L |
| 2                                  | 107.6          | 893.2           | 35.06          | 163.12          |
| 9                                  | 1304.4         | 2436            | 124.98         | 1556.2          |
| 16                                 | 2534           | 5327            | 739.4          | 2224            |

De este mismo experimento, se obtuvo la gráfica de efectos principales (Figura 8.2), la cual indica a través de la pendiente qué variables son las que dominan el proceso para que exista una mayor cantidad de COT disuelto, es decir, entre mayor sea la pendiente entre un mismo tratamiento, mayor es el efecto inducido. La Figura 8.2 muestra que las variables que afectan el proceso son un pH alto, mayor concentración inicial de SH y el proceso de sulfonación.



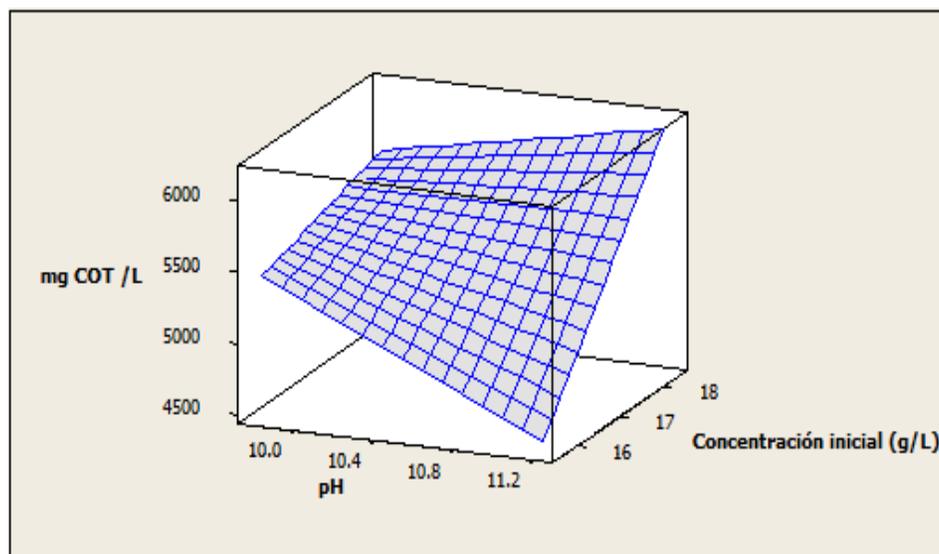
**Figura 8.2** Efecto de diferentes parámetros en la solubilidad de LS. Tratamiento: 1: Sulfonado 2: No sulfonado

El modelo lineal general presentó un valor en la desviación estándar ajustada de 83.2, con valores estadísticos de P de 0.016 0.008, 0.016 y 0.154 para las variables pH, concentración inicial, tratamiento de sulfonación y la combinación pH

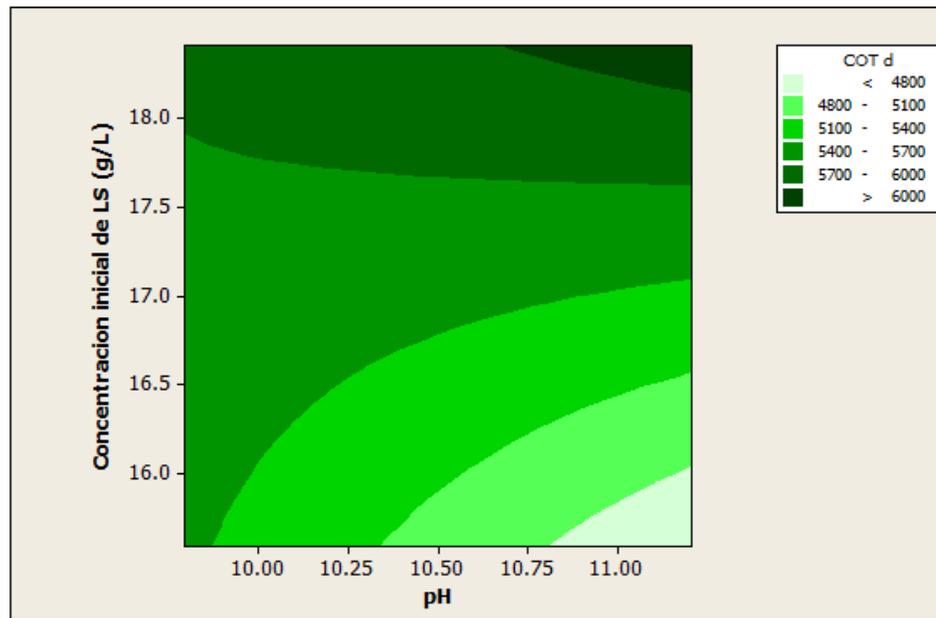
y tratamiento, respectivamente. Para dicho análisis se tomó un nivel de confianza del 95%, por lo tanto para valores de  $p > 0.05$  la variable no es significativa. Por lo tanto, en este caso la única variable que no fue significativa fue la combinación de pH y tratamiento (sulfonado/no sulfonado).

### 8.3.2 Optimización del proceso de solubilización de LS por el diseño de superficie de respuesta

Una vez obtenidos los resultados de solubilidad, y observando que LS daba un incremento de COT soluble, agregando la misma cantidad de SH y con el mismo pH, en comparación con LC, se procedió a optimizar las condiciones bajo las cuales se obtendría una mayor solubilidad de LS. Para lo cual, se utilizó el diseño experimental de superficie de respuesta. El programa Minitab versión 14.1.0.0 generó distintas combinaciones entre pH (10-11) y concentración inicial de LS (16 y 18 g/L) con 5 puntos centrales, 4 puntos en el cubo y 4 fuera del intervalo de pH y fuera del intervalo de las concentraciones iniciales establecidas. Las Figuras 8.3 y 8.4 muestran la gráfica de superficie de respuesta y la gráfica de contorno, respectivamente, obtenida del análisis.



**Figura 8.3** Gráfica de superficie de respuesta para la optimización de solubilidad de LC



**Figura 8.4** Gráfica de contorno para la solubilidad LS en términos de COT disuelto (mg COT/L)

Mediante el modelo de superficie de respuesta se obtuvo un valor del coeficiente de regresión lineal ajustada de 56.4, un valor de P de 0.314, 0.003 y 0.212 para las variables pH, concentración inicial y la combinación de pH/concentración inicial, respectivamente, con un nivel de confianza de 95%. En esta prueba, los valores de p indican que la variable que es significativa para obtener una mayor concentración de mg COT/L disueltos es la concentración inicial de SH que se agregue.

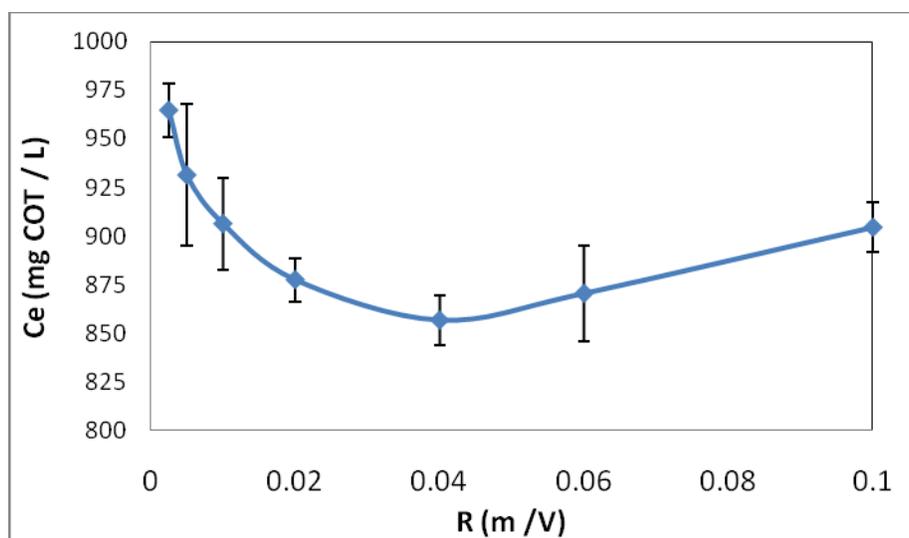
Para evaluar la reproducibilidad de la gráfica de contorno se probó una cantidad de 16 g de LS /L a un pH de 10.3, el cual mostró tener al final una concentración disuelta de 5336 mg COT/L. Mientras que las dos muestras que se prepararon bajo las mismas condiciones (16 g LS/L y pH 10) tuvieron una concentración final de 5328 y 5326 mg COT/L, por lo que todas las muestras estuvieron dentro del intervalo esperado por la gráfica de contorno, demostrando la reproducibilidad del método cuando se inicia bajo las mismas condiciones.

#### 8.4 Relación masa/volumen, cinética de adsorción e isothermas de adsorción

Una vez obtenidas las condiciones óptimas de solubilidad y observando que se obtuvo una mayor concentración de COT con LS, y tomando en cuenta los resultados obtenidos por Yudov *et al.* (2005), donde establecen que la sulfonación no presentó efectos tóxicos en microorganismos, se procedió a realizar las pruebas de adsorción, únicamente con la fracción soluble de dicha sustancia húmica.

##### 8.4.1 Relación masa/volumen

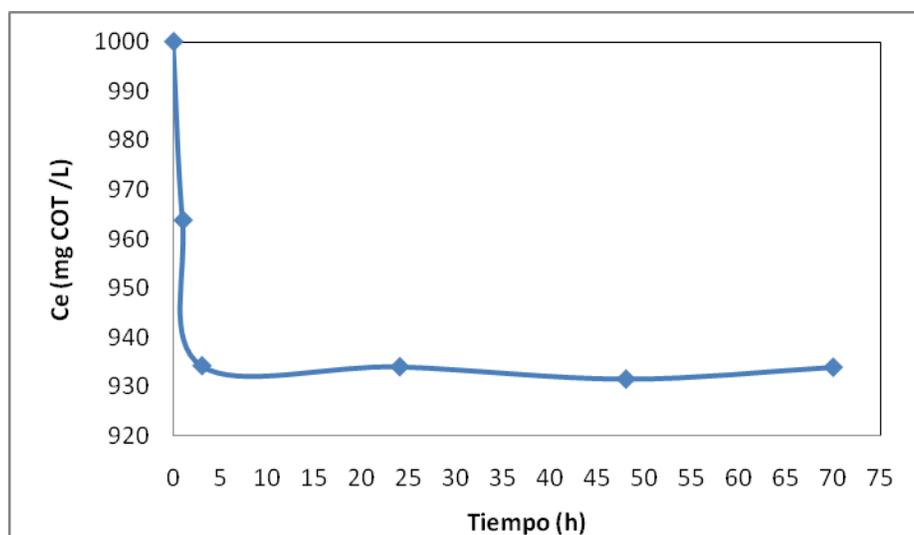
El experimento de la relación m/V se realizó para encontrar las condiciones óptimas bajo las cuales se adsorbiera mayor cantidad de COT disuelto en la resina Amberjet. En dicho experimento se probaron diferentes valores de la relación m/V (masa resina/volumen de SH) por duplicado desde 0.00025 hasta 0.100 g/mL. La concentración inicial fue de 996.4 mg/L ajustada a un pH inicial de 7. En la Figura 8.5 se presentan los resultados obtenidos en el experimento, en la cual se observa que con una relación de 0.02g/mL se cubre la resina a su máxima capacidad, bajo las condiciones del experimento, dado que en las relaciones mayores siguientes ya no existe una diferencia significativa en la adsorción de LS.



**Figura 8.5** Efecto de la relación masa/volumen (m/V) en la adsorción de LS. Ce: concentración en el equilibrio.

#### 8.4.2 Cinética de adsorción

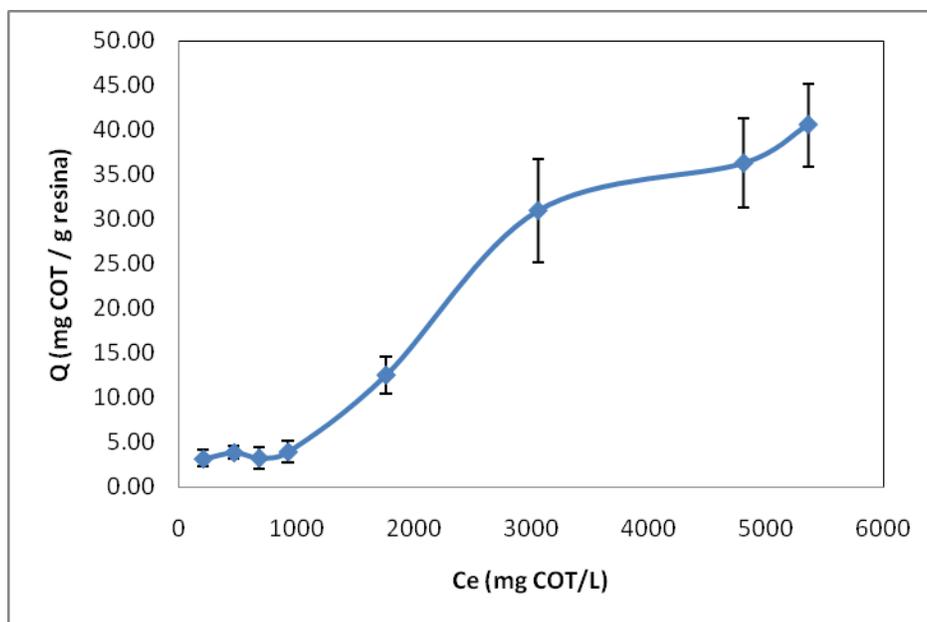
En la Figura 8.6 se presenta la cinética de adsorción de COT, en la cual se observa que, desde la hora 3, la concentración de COT había alcanzado el equilibrio con una adsorción del 6.57% del COT inicial.



**Figura 8.6** Cinética de adsorción de LS en resina Amberjet. pH inicial de 7 y relación m/V de 0.02 g/mL. Ce: concentración en el equilibrio

#### 8.4.3 Isoterma de adsorción

Una vez encontradas las condiciones de relación m/V y tiempo de equilibrio, se realizaron las isotermas de adsorción de LS en términos de COT disuelto. Las concentraciones iniciales de COT disuelto fueron: 250, 500, 750, 1000, 2000, 3500, 5000, 6000 y 6500 mg/L. En la isoterma de adsorción (Figura 8.7) se encontró que la capacidad máxima de adsorción fue de 40.6 mg COT/g resina. La isoterma presenta una forma tipo S.

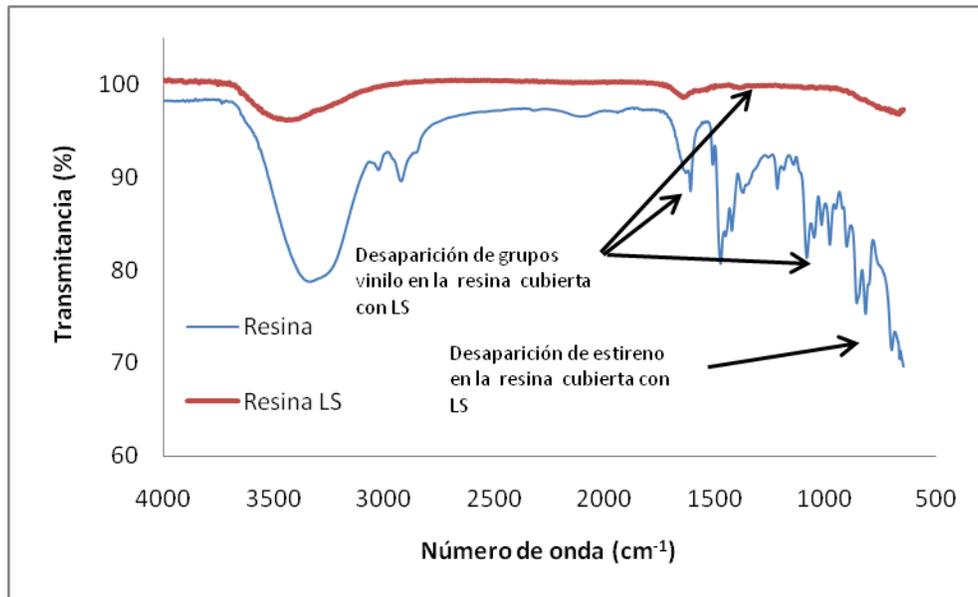


**Figura 8.7** Isoterma de adsorción de LS en resina Amberjet. pH inicial de 7. Tiempo de equilibrio 24 h; relación m/V 0.02g/mL. Ce: Concentración en el equilibrio; Q: cantidad adsorbida

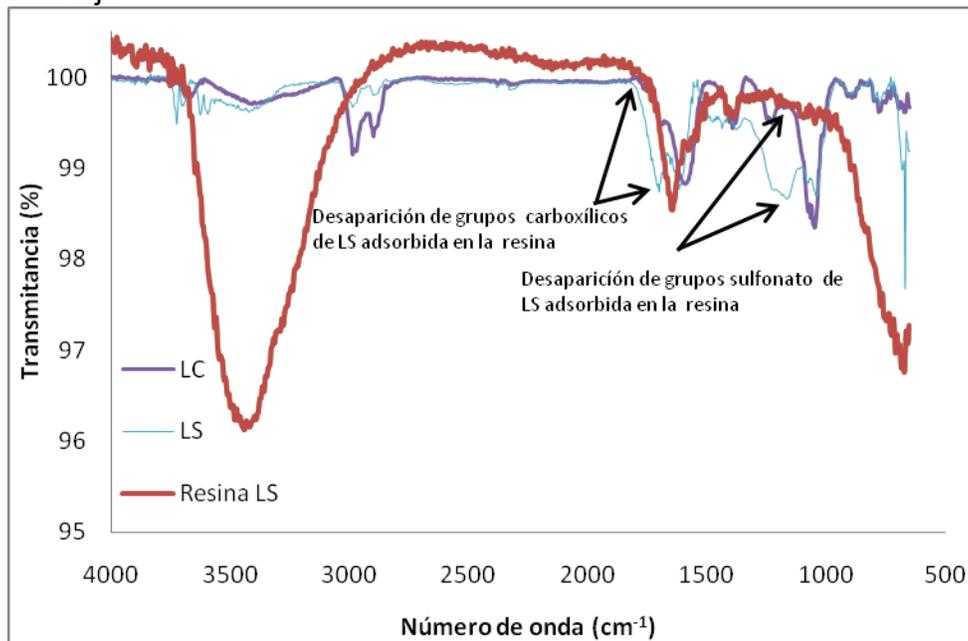
Además, a través de los espectros infrarrojo de la resina y LS adsorbida en la resina (Figura 8.8), se observa la desaparición de la mayoría de las bandas que indican la presencia de grupos vinilo: 1648 a 1638, 995 a 985 y 915 a 905  $\text{cm}^{-1}$  y el grupo estireno, que aparece en los picos de compuestos aromáticos apreciables de 675 a 900  $\text{cm}^{-1}$  (Silverstein y Webster, 1997), lo que indica que la superficie de la resina (co-polímero estireno divinilbenceno) fue cubierta por la LS. Además, otro aspecto importante en la resina cubierta con leonardita sulfoanda, es la desaparición de la banda de 1050 a 1200  $\text{cm}^{-1}$  atribuida a los grupos sulfonato y la desaparición de los grupos carboxílicos alifáticos y aromáticos (1700  $\text{cm}^{-1}$ ) en la leonardita sulfonada (Figura 8.9). Igualmente, es necesario hacer énfasis en que los grupos carbonilo de interés para el transporte de electrones de la LS (1630 a 1700  $\text{cm}^{-1}$ ) permanecen en la resina cubierta.

Por otro lado, la banda de  $\text{OH}^-$  (3000 a 3600  $\text{cm}^{-1}$ ) en la resina sin LS como en la cubierta con LS se debe a la alta capacidad hidrofílica que ésta tiene, por lo que probablemente se está observando agua adsorbida en la resina. Así mismo, es

visible, en la resina, la banda en 2850 a 2900  $\text{cm}^{-1}$  que indica la presencia de grupos  $\text{CH}_2$  de cadenas alifáticas. La desaparición de los grupos funcionales tanto de la resina y como de la leonardita una vez que esta se encuentran en contacto con la resina, brindan una importante información la cual será discutida en la sección 9.2 de este documento.



**Figura 8.8** Espectro infrarrojo de la resina, LS adsorbida en resina Amberjet



**Figura 8.9** Espectro infrarrojo de LS adsorbida en resina (Resina LS), leonardita control (LC) y leonardita sulfonada (LS)

### 8.5 Pruebas de desorción

Para verificar la robustez con la que se logró la adsorción de LS en la resina, se realizó un ciclo de desorción con el medio mineral utilizado en los experimentos de bio-transformación de compuestos aromáticos nitrogenados. Antes de iniciar cada ciclo, la resina se lavó con agua desionizada y con medio basal. La relación m/V utilizada fue de 0.020 g/mL, se ajustó el pH inicial a un valor de  $7 \pm 0.1$ . Para evaluar el grado de desorción de la resina, se hicieron mediciones de COT disuelto en el equilibrio. En la Tabla 8.2 se observa los diferentes porcentajes de desorción que se obtuvieron conforme la cantidad adsorbida aumentaba. En este sentido se puede observar que a concentraciones iniciales bajas donde se adsorbe menos de 5 mg COT/g resina los porcentajes están por arriba del 15 %, mientras que a concentraciones iniciales altas (arriba de 2000 mg COT/L) los porcentajes de desorción resultaron estar abajo del 10 %. La causa se analiza en la sección 9.3.

**Tabla 8.2** Porcentaje de desorción en resinas amberjet cubiertas de leonardita sulfonada

| Concentración inicial (mg COT/L) | mg COT / g resina |                   | % Desorción |
|----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------|
|                                  | Antes Desorción   | Después Desorción |             |
| 202                              | 3.17              | 2.25              | 28.93       |
| 464                              | 3.87              | 2.90              | 25.11       |
| 679                              | 3.27              | 2.23              | 31.79       |
| 925                              | 3.96              | 3.20              | 19.13       |
| 1758                             | 12.56             | 11.83             | 5.84        |
| 3052                             | 30.96             | 29.94             | 3.30        |
| 4803                             | 36.27             | 35.15             | 3.11        |
| 5352                             | 40.57             | 39.74             | 2.04        |

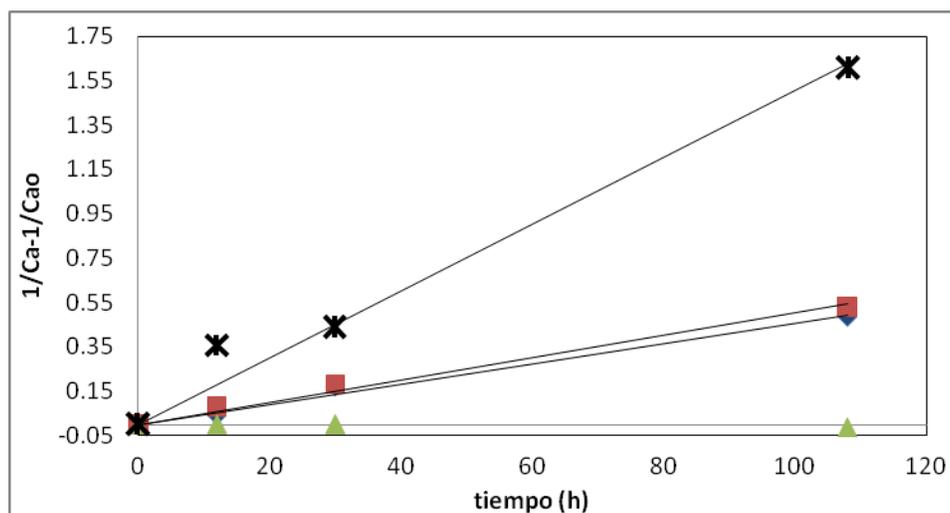
### 8.6 Experimentos en lote de bio-transformación de RR2 en presencia LS disuelta y adsorbida en resina Amberjet y de 4NF en presencia de LS inmovilizada en resina Amberjet

Para comprobar la actividad catalítica de las SH inmovilizadas, se realizaron pruebas en lote para la bio-transformación de un colorante azo (RR2) y un compuesto nitroaromático (4NF). Para verificar la transformación reductiva de

ambos contaminantes, se realizó un barrido espectrofotométrico de las muestras una vez que se alcanzó la desaparición total de ambos contaminantes. Los resultados fueron ajustados a modelos de orden 0, primer orden y segundo orden.

### 8.6.1 Experimentos de bio-transformación de 4NF

En la Figura 8.10 se presenta la cinética de reducción del 4NF en presencia de 25 y 50 mg COT/L inmovilizado en resina Amberjet. La cinética de transformación de 4NF presentó un mejor coeficiente de correlación para el modelo de 2<sup>do</sup> orden de reacción. Como se puede observar, la tasa de consumo de 4NF no se ve beneficiada por la presencia de SH inmovilizadas en los cultivos. La tasa de consumo del control biológico sin SH ( $0.015 \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$  con una  $R^2= 0.98$ ) es 3 veces mayor respecto a los tratamientos biológicos con 25 y 50 mg COT-Inmovilizados/L ambos con una tasa de transformación de  $0.005 \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$  con una  $R^2=0.99$ . Se puede observar que la presencia de una mayor cantidad de SH inmovilizada no incrementa la tasa de transformación, las posibles causas de este fenómeno y el motivo por el cual la cinética se ajusta mejor a un 2<sup>do</sup> de orden de reacción se analizan con detenimiento en la sección 9.5.



**Figura 8.10** Cinética de conversión de 4NF por un lodo metanogénico disgregado en presencia de LS adsorbida en resina Amberjet. ■ 50 mg COT Inmovilizado/L, ◆ 25 mg COT-Inmovilizado/L, \* Control biológico (sin LS adsorbida en resina) y ▲ Control estéril con LS adsorbida en resina (Incubado sin microorganismos y sin glucosa)

Considerando estos resultados, que indican que las SH inmovilizadas en la resina Amberjet no muestran un efecto favorable sobre la reducción del 4-NF y considerando que varios estudios reportan el impacto que presentan las SH suspendidas sobre la reducción de este contaminante y otros nitroaromáticos (Schwarzenbach *et al.*, 1990; Mendoza-Macías *et al.*, 2009), se procedió a evaluar el efecto de las SH inmovilizadas sobre la reducción de RR2 y a compararlo con el obtenido con SH suspendidas

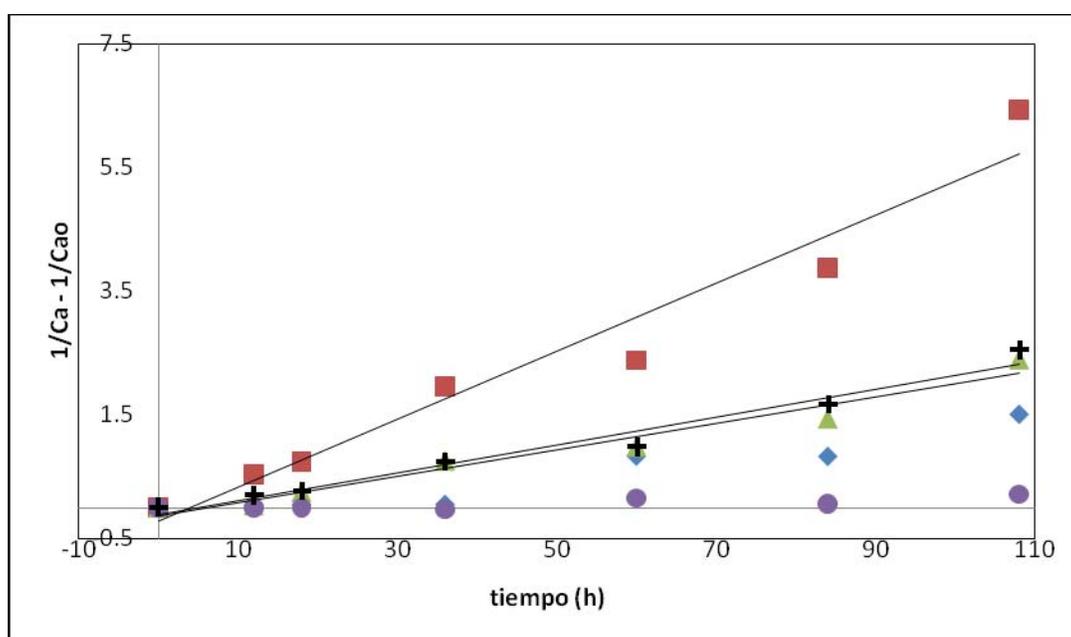
### 8.6.2 Experimentos de bio-transformación de RR2

Para la realización de este experimento se utilizó LS en forma disuelta e inmovilizada en resina Amberjet. Las concentraciones probadas, tanto en forma disuelta como inmovilizada, fueron 25, 50 y 100 mg COT/L. Así mismo, se utilizaron dos tipos de controles estériles (sin microorganismos ni glucosa) que incluían únicamente la LS disuelta o bien LS inmovilizada. Para evaluar el efecto de la comunidad microbiana en la reducción del colorante, se utilizaron controles biológicos (sin sustancias húmicas) los cuales fueron expuestos a las diferentes concentraciones de RR2 examinadas en los experimentos.

Es necesario mencionar que el orden de reacción en los ensayos en presencia de LS se ajusta con mayor coeficiente de regresión lineal a un modelo de 2<sup>do</sup> orden, no así para los controles biológicos sin sustancia húmica, en los cuales el coeficiente de regresión lineal es mayor cuando se ajusta a un 1<sup>er</sup> orden de reacción. Las tasas de decoloración de primer orden para los controles biológicos sin LS fueron de  $-0.0049$  ( $R^2= 0.99$ ) y  $-0.0024$  ( $R^2= 0.94$ )  $h^{-1}$  con concentraciones iniciales de 0.3 y 0.65 mM de RR2, respectivamente. Con el propósito de poder realizar un análisis congruente del efecto de LS, en comparación con los controles biológicos sin LS, se compararon las tasas de transformación obtenidas a partir el segundo orden de reacción como parámetro de medición.

En el experimento que se utilizó 100 mg COT/L (Figura 8.11), la presencia de LS inmovilizada incrementó 2.5 veces la tasa de decoloración del RR2, en

comparación del control biológico sin LS. Mientras tanto, el tratamiento con LS disuelta no mostró un efecto en la tasa de decoloración, incluso el control biológico sin LS mostró una tasa de decoloración 5% mayor respecto al cultivo con 100 mg COT/L disuelto. El porcentaje de decoloración de RR2 en el tratamiento con LS inmovilizada fue de 68.7% después de 108 horas, mientras que en el control sin SH y el tratamiento con 100 mg COT/L de LS disuelta presentaron una decoloración de 42.2 y 47.7%, respectivamente. El control estéril con 100 mg COT-Inmovilizado/L adsorbió una vez iniciada la cinética biológica 32 % lo que equivale a una eliminación de 12.97 mg RR2/ g resina-LS.



**Figura 8.11** Cinética de segundo orden de decoloración de RR2 por un lodo metanogénico disgregado en presencia de LS adsorbida en resina. (●) Control estéril con LS disuelta (sin microorganismos ni glucosa), (◆) Control estéril 100 mg COT-Inmovilizado/L (sin microorganismos ni glucosa), (▲) 100 mg COT disuelto /L (con microorganismos y glucosa), (+) Control biológico (sin leonardita sulfonada) y (■) 100 mg COT inmovilizado/L (con microorganismos y glucosa).

En los experimentos realizados con 50 mg COT/L se observó un incremento en la tasa de decoloración de RR2 de 2.05 veces del experimento con LS inmovilizada con respecto al control biológico (sin sustancias húmicas) siguiendo un modelo de segundo orden. Por otro lado, se observó que la misma cantidad de SH, pero en forma disuelta, incrementa en 1.10 veces la tasa de decoloración. La cantidad

removida por el proceso de adsorción fue de 9.9% lo que equivale a una adsorción de 17.94 mg RR2 / g resina-LS. Por otra parte, la presencia de 25 mg COT/L mostró un ligero aumento de la tasa de decoloración, tanto en la forma inmovilizada como en la forma disuelta, respecto al control biológico sin sustancias húmicas. En este caso en particular, la forma disuelta tuvo un mejor desempeño en comparación de la inmovilizada. Los datos resumidos de porcentaje de decoloración y tasas de decoloración se muestran en la Tabla 8.3 y Tabla 8.4, respectivamente.

**Tabla 8.3** Porcentajes de decoloración de RR2 observadas en diferentes condiciones experimentales

|              | mg COT /L | Ci (mM RR2)  | Cf (mM RR2)  | Porcentaje de decoloración% |
|--------------|-----------|--------------|--------------|-----------------------------|
| <b>COT-I</b> | 25        | 0.69 ± 0.04  | 0.48 ± 0.01  | 30 ± 3                      |
| <b>COT-I</b> | 50        | 0.61 ± 0.01  | 0.39 ± 0.02  | 36.0 ± 1.4                  |
| <b>COT-I</b> | 100       | 0.35 ± 0.06  | 0.11 ± 0.01  | 68.7 ± 4.2                  |
| <b>COT-D</b> | 25        | 0.62 ± 0.02  | 0.45 ± 0.03  | 27.2 ± 2.4                  |
| <b>COT-D</b> | 50        | 0.75 ± 0.02  | 0.56 ± 0.03  | 25 ± 2.5                    |
| <b>COT-D</b> | 100       | 0.38 ± 0.01  | 0.20 ± 0.01  | 47.7 ± 3.1                  |
| <b>CB</b>    | ---       | 0.66 ± 0.05  | 0.46 ± 0.01  | 25 ± 1.2                    |
| <b>CB</b>    | ---       | 0.29 ± 0.03  | 0.17 ± 0.01  | 42.2 ± 8.0                  |
| <b>CE-I</b>  | 50        | 0.67 ± 0.01  | 0.56 ± 0.0   | 9.9 ± 5.3                   |
| <b>CE-I</b>  | 100       | 0.29 ± 0.18* | 0.20 ± 0.15* | 32.0 ± 9.5                  |
| <b>CE-D</b>  | 100       | 0.41 ± 0.0   | 0.38 ± 0.01  | 8.1 ± 2.8                   |

COT-I: Carbón Orgánico Total-Inmovilizado; COT-D: Carbono Orgánico Total-Disuelto; CB: Control Biológico (Sin sustancia húmica); CE-I: Control Estéril-Inmovilizado (Sin lodo metanogénico y sin glucosa); CE-D: Control Estéril-Disuelto (Sin lodo metanogénico y sin glucosa); Ci mM: Concentración inicial mili Molar de RR2; Cf mM: Concentración final mili Molar de RR2 y RR2: Rojo Reactivo 2; \*En el triplicado del ensayo CE-I con 100 mg COT/L se efectuó un error en la adición de colorante sin embargo se le dio seguimiento al triplicado para fines experimentales.

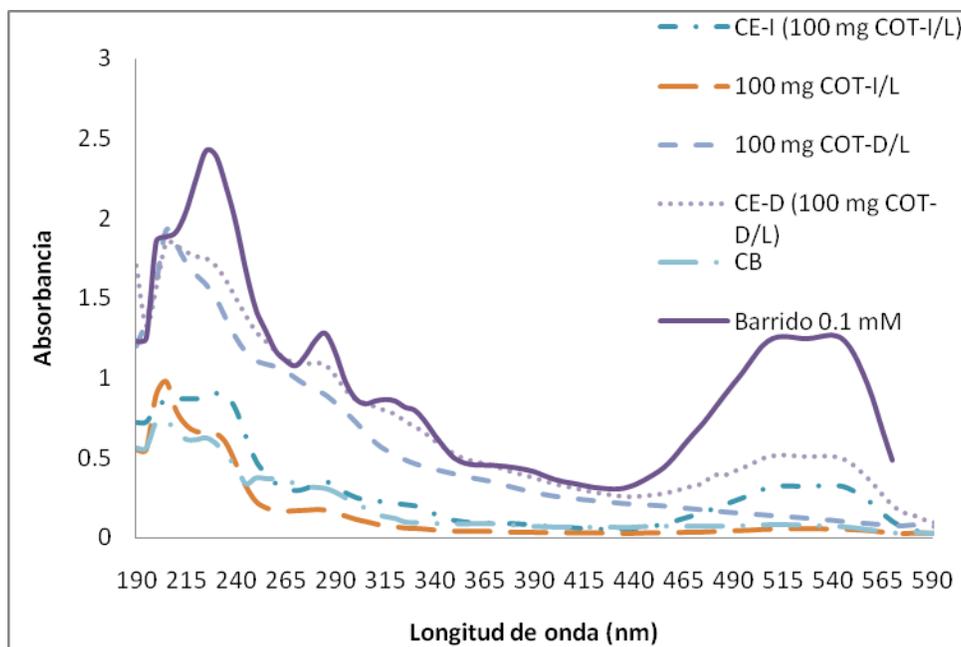
**Tabla 8.4** Tasas de decoloración de RR2 observadas en diferentes condiciones experimentales

|               | mg<br>COT/L | 2do orden                            |                | Relación |
|---------------|-------------|--------------------------------------|----------------|----------|
|               |             | K(mM <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) | R <sup>2</sup> | Kt /K-CB |
| <b>COT-I</b>  | 100         | 0.0521                               | 0.95           | 2.48     |
| <b>COT-I</b>  | 50          | 0.0086                               | 1.00           | 2.05     |
| <b>COT-I</b>  | 25          | 0.0059                               | 0.99           | 1.40     |
| <b>COT-D</b>  | 100         | 0.02                                 | 0.95           | 0.95     |
| <b>COT-D</b>  | 50          | 0.0046                               | 0.90           | 1.10     |
| <b>COT-D</b>  | 25          | 0.0067                               | 0.91           | 1.60     |
| <b>CB-100</b> | ---         | 0.021                                | 0.96           | ---      |
| <b>CB-50</b>  | ---         | 0.0042                               | 0.92           | ---      |

COT-I: Carbón Orgánico Total-Inmovilizado; COT-D: Carbono Orgánico Total-Disuelto; CB 100: Control Biológico (Sin sustancia húmica) del tratamiento con 100 mg COT/L; CB 50: Control biológico (sin sustancias húmicas) del tratamiento con 50 mg COT/L; RR2: Rojo Reactivo 2 y Kt/K CB: Constante de decoloración de cada tratamiento/Constante de decoloración del control biológico.

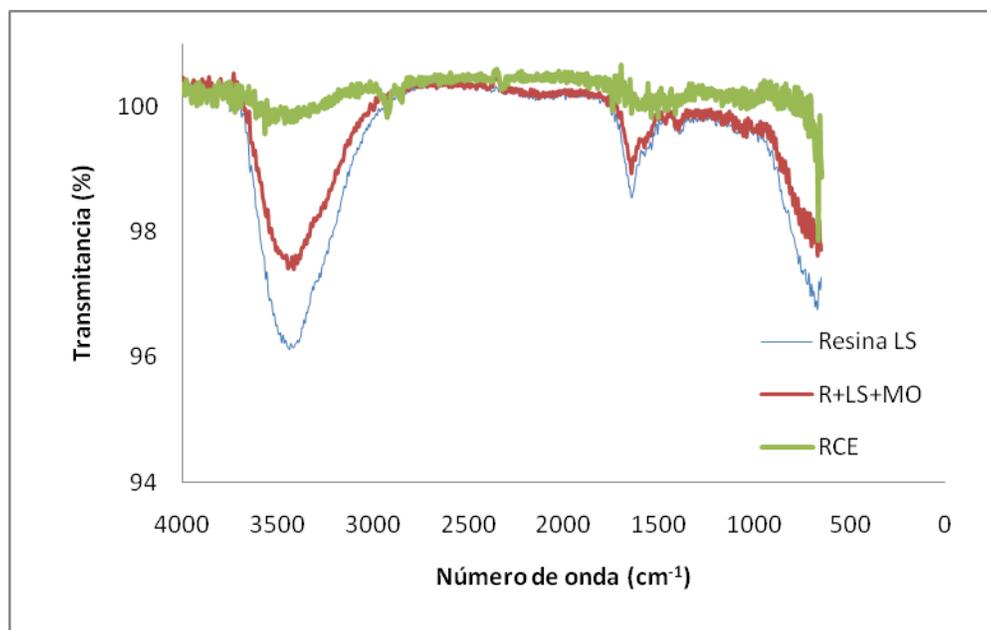
Para corroborar la reducción biológica del colorante, se muestra en la Figura 8.12 el barrido espectrofotométrico final realizado a los diferentes tratamientos. En dicho barrido se puede observar la desaparición del pico (539 nm) o bien, la desaparición de todo el hombro del colorante en la región UV visible (505 a 545 nm), en los tratamientos con LS disuelta e inmovilizada. Del mismo modo, se observa en el control biológico sin sustancias húmicas la desaparición de esa parte del espectro.

En los tratamientos anteriores, la región de 200 a 230 nm, se modifica respecto al estándar de RR2 y a los controles estériles (sin microorganismos ni glucosa) lo que indica la aparición de anilinas. Los controles estériles conservan la forma original del barrido realizado al estándar lo que indica que aunque la intensidad de la señal disminuya, la estructura del colorante no se afecta, sólo se adsorbe.



**Figura 8.12.** Barrido espectrofotométrico de los tratamientos utilizados en presencia de LS (100 mg COT/L) disuelta e inmobilizada, control biológico y estéril en el tiempo final. CE-I: Control estéril con leonardita inmobilizada; CE-D: Control estéril con leonardita disuelta; CB: Control Biológico; COT-I: Carbón orgánico total inmobilizado y COT-D: Carbón orgánico total disuelto.

Finalmente, los espectros infrarrojos (Figura 8.13) realizados a la resina cubierta de SH del ensayo con microorganismos, indican dos cosas importantes: primero, un indicio de que el colorante, en presencia de microorganismos, fue reducido incluso en la resina ya que no se observa otro pico en el espectro infrarrojo que no pertenezca al de la resina cubierta de SH. Y segundo, la conservación de la forma del espectro infrarrojo en comparación con la resina cubierta previa al tratamiento, lo que es una evidencia de que no existió un fenómeno que promoviera la desorción de los grupos carbonilo asociados a grupos quinona que aparecen en la bandas  $1400\text{ cm}^{-1}$  y de  $1580\text{ a }1620\text{ cm}^{-1}$ . Por otra parte, en el barrido infrarrojo realizado a la resina del control estéril sin microorganismos, se observa ruido en la medición lo que puede indicar que el colorante y los distintos compuestos del medio basal se encuentran adsorbidos en la resina ya que se pierde la forma original del espectro de la resina cubierta de SH previo al tratamiento.



**Figura 8.13.** Comparación del espectro infrarrojo de la resina cubierta con LS y la resina cubierta con LS utilizada en los ensayos de la cinética de bio-transformación de RR2. Resina LS: resina cubierta con LS antes de la cinética de bio-transformación de RR2; R+LS+MO: Resina cubierta con LS después la cinética de bio-transformación de RR2 del experimento en presencia de microorganismos y RCE: Resina cubierta con LS después la cinética de bio-transformación de RR2 del experimento sin microorganismos (control estéril).

## 9 Discusión de resultados

### 9.1 Solubilidad de leonardita

La sulfonación es definida como una reacción de sustitución, utilizada para añadir el grupo  $\text{SO}_3\text{H}$  en la molécula de un compuesto orgánico, comúnmente mediante un enlace químico al carbón o menos frecuentemente a un átomo de nitrógeno de un compuesto orgánico. Generalmente, la sulfonación de un polímero se lleva a cabo mediante una reacción heterogénea; es decir el polímero y el agente sulfonante existen en diferentes fases, o bien en una fase homogénea si la reacción se efectúa con hidrocarburos y disolventes clorados (Martins *et al.*, 2003).

Debido a las interesantes propiedades químicas y mecánicas de los materiales sulfonados, éstos son utilizados en aplicaciones industriales como mezclas compatibles con polímeros no miscibles, materiales de intercambio iónico, membranas de ósmosis inversa y ultrafiltración, plastificadores para concreto y compositos conductivos. Generalmente, la sulfonación de polímeros procede con las siguientes características: 1) distribución al azar de los grupos  $\text{SO}_3\text{H}$  insertados a lo largo del polímero, 2) una mínima heterogeneidad de cadena a cadena y 3) la sulfonación procede sin una degradación significativa del polímero (Fu & Weiss, 1997).

Tomando en cuenta lo anterior, en el presente estudio la sulfonación se llevó a cabo mediante una reacción heterogénea, debido a que la leonardita se encontraba en una fase sólida y el ácido clorosulfónico en una fase líquida. Un posible mecanismo por el cual los grupos sulfonato se pudieron haber integrado a la leonardita es mediante la adición del grupo sulfonato a anillos aromáticos y/o a cadenas alifáticas de ésta. En el análisis infrarrojo realizado a la leonardita sulfonada, se puede observar la adición de grupos sulfonato en la banda de  $1200\text{ cm}^{-1}$  lo que evidencia la presencia de dichos iones, estos mismos análisis de LS no presentan un cambio en la banda de los grupos carbonilo que también se

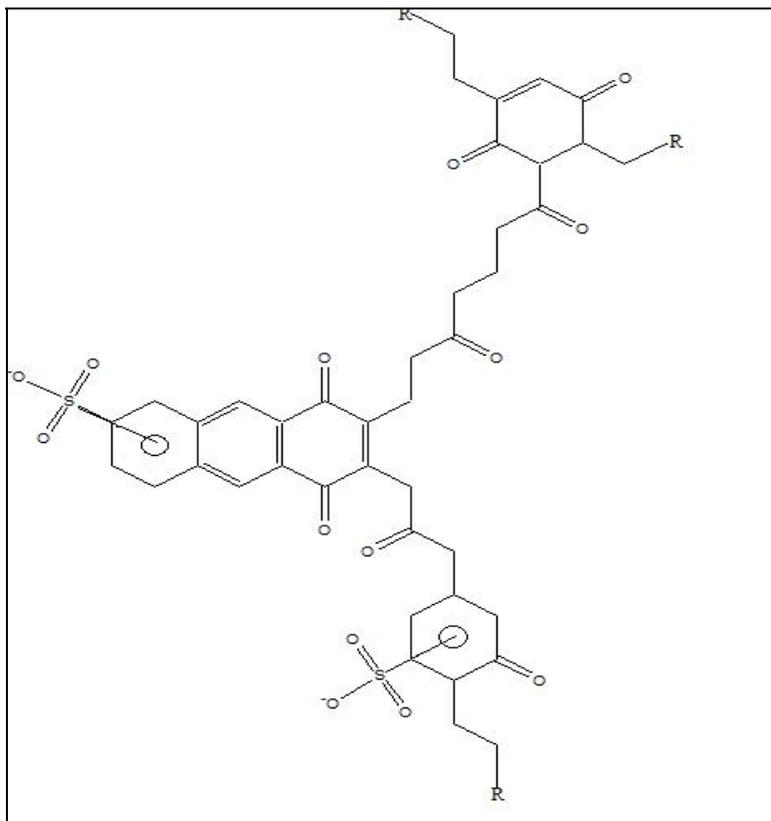
observa en la leonardita control (sin sulfonar), lo que indica que no existió una pérdida de dichos grupos de interés para el transporte de electrones.

De igual forma, los análisis muestran la aparición de grupos carboxilo en cadenas alifáticas y compuestos aromáticos en LS lo que puede indicar que a través de los tratamientos de centrifugado, lavado y diálisis, parte del material que impedía ver en el espectro infrarrojo los grupos carboxílicos en LC, fue eliminado y de esta forma pudieron ser detectables. Yudov *et al.* (2005) realizaron la sulfonación con la misma metodología a la leonardita y como parte de los análisis para aseverar que se habían añadido los grupos sulfonato realizó una determinación de los grupos ácidos fuertes (metodología Ca-acetato) y de sitios de enlaces metálicos una vez que se había sulfonado. Los resultados mostraron un incremento en los grupos ácidos de  $2.9 \pm 0.5$  COOH mmol/g en leonardita sin sulfonar a  $4.5 \pm 0.1$  mmol COOH + SO<sub>3</sub>H mmol/g de leonardita sulfonada, respectivamente, mientras que los grupos para la formación de sitios de enlace fuerte se incrementaron de 3.2 a 4.4 mmol Fe/g y de 2.2 a 4.5 mmol Hg/g de leonardita a leonardita sulfonada.

Por otra parte, los análisis EDX realizados a leonardita sulfonada no muestran la presencia del ión cloro, lo que puede indicar que los grupos sulfonato debieron haber quedado libres ya que el cloro se desprendió de la estructura al momento de reaccionar con la molécula del humus y fue eliminado por la diálisis realizada a la leonardita como parte de la metodología de sulfonación.

Es de esperarse que la reacción de sulfonación con un ácido húmico (Figura 9.1) se llevaría a cabo sin afectar los grupos carbonilo e hidroxilo de las estructuras aromáticas, mismos que son los encargados del transporte de electrones. Esta observación fue corroborada en los ensayos en los que se probó la capacidad de transferencia de electrones de las sustancias húmicas sulfonadas, tanto solubles como inmobilizadas, durante la conversión del colorante RR2. De haberse modificado los grupos quinona de las SH por el proceso de sulfonación, no se hubiera observado un impacto favorable en el proceso de decoloración. Estudios complementarios apoyaron también esta teoría, ya que la aplicación de las

mismas SH en un proceso de deshalogenación de tetracloruro de carbono (TCC), aumentó la velocidad de deshalogenación de TCC por un consorcio reductor de humus (Márquez- Pavón, 2009).



**Figura 9.1** Fracción de una estructura modelo de un ácido húmico sulfonada.

En cuanto a los experimentos de solubilidad, éstos fueron de gran utilidad para determinar en qué grado la sulfonación aumenta la cantidad de COT disuelto. La sulfonación tuvo un efecto positivo en la cantidad de COT disuelto obtenido en todos los valores de pH y concentraciones de SH probadas, siendo la combinación pH 10 y concentración inicial 2 g/L la que mostró un efecto más notorio con un aumento del COT disuelto en 5.5 veces de LS en relación de LC (Tabla 8.1). Esto tiene como principal consecuencia que las estructuras que contienen carbono, como las quinonas, estén más disponibles en la fase soluble. Los resultados obtenidos en las pruebas de solubilidad concuerdan con los

obtenidos por Yudov *et al* (2005), en los cuales también observaron incremento de la solubilidad de leonardita sulfonada respecto a la leonardita parental. Es importante destacar que en este mismo estudio señalan la importancia de realizar más estudios en los cuales se examinen los grupos encargados de incrementar la solubilidad una vez que las SH son sulfonadas.

Por otra parte, hasta el momento, no se ha reportado ningún método que estime, a través del ajuste inicial de pH y cantidad agregada de SH, la cantidad de COT disuelto que se obtendrá, por lo que el estudio presenta una contribución importante para obtener soluciones de SH reproducibles y homogéneas. Cabe destacar que gracias a las pruebas de solubilidad, las isotermas de adsorción de LS en resina fueron reproducibles.

## 9.2 Adsorción de sustancias húmicas sulfonadas en una resina de intercambio iónico

Como se mencionó en la sección de resultados, una vez corroborado que la sulfonación incrementó la cantidad de COT disuelto y considerando que Yudov *et al.* (2005) habían encontrado en leonardita sulfonada una mayor cantidad de sitios ácidos y sitios de enlace fuerte, se procedió a utilizar sólo la LS en las actividades posteriores del presente trabajo. Por lo que una de las principales ventajas de trabajar con la información obtenida de la optimización de solubilidad de LS, fue la realización de las pruebas relacionadas con la relación m/V, cinética e isotermas de adsorción bajo condiciones que permitieran establecer parámetros más controlables y homogéneos.

De las isotermas de adsorción, utilizando la fracción soluble de LS, se obtiene una cantidad máxima adsorbida de 40 mg COT / g resina, en comparación con los resultados obtenidos por Yang *et al* (2009) en los cuales utilizaron partículas nanométricas de  $\text{TiO}_2$ ,  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{ZnO}$  y  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  para adsorber ácido húmico proveniente de turba y se obtuvo una adsorción de 92, 80, 20 y 4 mg/g, respectivamente, a pH 5. Sin embargo, es importante mencionar que en el estudio

de Yang *et al* (2009) ocuparon turba como fuente de ácidos húmicos, lo que tiene como consecuencia que la composición química de dicha SH varía respecto a la leonardita utilizada en el presente estudio.

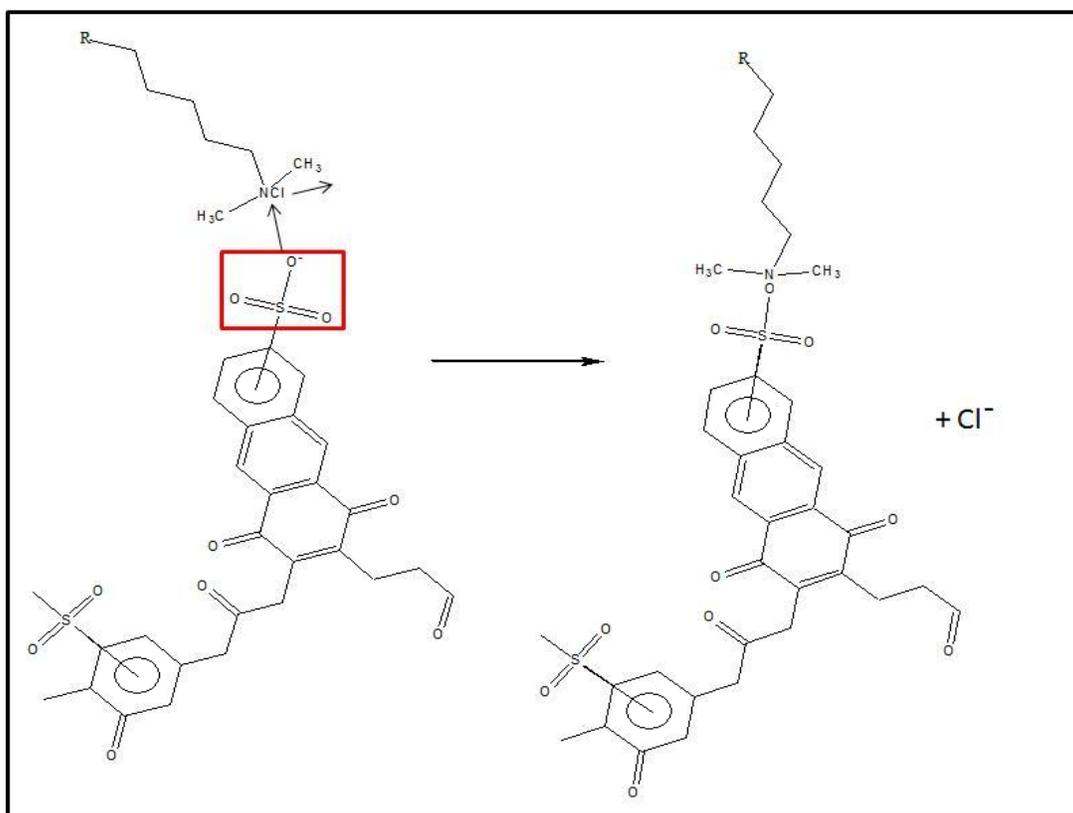
En dicho estudio se encontró que no había una relación directa entre el área superficial del adsorbente y la cantidad adsorbida de SH, y atribuyeron la adsorción a fuerzas electrostáticas o intercambio de ligandos. Los autores de este trabajo proponen que el intercambio de ligandos entre las superficies minerales y los grupos hidroxilo de la materia orgánica es favorecido por tres pasos: 1) protonación de los grupos hidroxilo superficiales, lo que provoca que ocurra un mayor intercambio entre ambos materiales, 2) complejación de la esfera externa de la superficie del grupo carboxilato con el grupo hidroxil protonado; y 3) intercambio de ligandos que generan un complejo de esfera interna.

Como resultado de las características no uniformes de la materia orgánica, la adsorción de ésta en diferentes tipos o en una misma superficie, se puede comportar muy heterogéneamente; por ejemplo, en el estudio presentado por Yang *et al.* (2009) la adsorción se ajusta a un modelo de Freundlich; sin embargo, en el presente estudio la isoterma presentó una forma tipo "S". De igual forma, en el estudio presentado por Klavins *et al.* (2006) se observa una isoterma tipo "S" en la adsorción de SH en matrices epóxicas y de sílica gel, lo cual fue explicado por una baja afinidad adsorbato-adsorbente a bajas concentraciones y a un aumento de la adsorción con el incremento de la concentración del adsorbato.

Juhna *et al.* (2003) inmovilizaron SH en material de un acuífero; sin embargo, por la heterogeneidad de las SH utilizadas y la característica del método de cuantificación no puede aseverarse cuánta SH fue adsorbida con precisión. En el estudio presentado por Klavins y Eglite (2000) se presentan varios métodos efectivos para inmovilizar SH; no obstante, la adsorción se llevó a cabo a través de los grupos OH, los cuales son los principales encargados de la transferencia de electrones en reacciones redox. Debido a lo anterior, cabe destacar que el

método para realizar las isotermas con la fracción soluble permite establecer de manera precisa cuánta cantidad existe en términos de COT adsorbida en la resina, lo cual indica que una de las principales ventajas de este método es conocer con certeza la cantidad de SH que se adsorbe, en términos de COT, para ser utilizada en posteriores experimentos.

Como se mencionó anteriormente, uno de los objetivos de efectuar la adición de grupos sulfonato, a través de la sulfonación, fue el de incrementar la capacidad de intercambio iónico de leonardita con la resina. En los experimentos de adsorción del presente trabajo, la resina pudo interactuar a través de un intercambio iónico del Cl<sup>-</sup> de la amina cuaternaria que dicha resina contiene, con los grupos SO<sup>3-</sup> de la leonardita sulfonada como se esquematiza en la Figura 9.2. Lo anterior puede ser constatado a partir de los espectros infrarrojos (Figura 8.9), ya que la banda del grupo sulfonato (1200 cm<sup>-1</sup>) de la leonardita sulfonada desaparece una vez que esta se adsorbe en la resina. Así mismo, los grupos funcionales del espectro infrarrojo del co-polímero estireno divinilbenceno que constituyen a la resina se pierden una vez que esta se encuentra cubierta por LS. Esta información sugiere que el mecanismo de adsorción entre la LS y la resina fue mediante un intercambio iónico.



**Figura 9.2** Mecanismo propuesto de adsorción entre resina Amberjet y leonardita sulfonada

Si bien es cierto que el mecanismo por intercambio iónico explicado anteriormente entre la resina y la LS es evidente, la naturaleza de la leonardita permitiría que la adsorción se llevara a cabo también mediante otros mecanismos. Uno de estos mecanismos que explicaría la adsorción, sería a través de los grupos carboxílicos de la leonardita, esta adsorción es favorecida en este sistema por las cargas negativas provocadas por el valor del pH. Es decir, ya que la adsorción se llevó a cabo bajo un pH de 7, esto pudo haber inducido que los grupos carboxilo que contiene el humus (Stevenson, 1994), los cuales en su mayoría tienen un pKa menor de 5.00, incluyendo al ácido benzoico, ácido fenil acético y el ácido hexanoico, con valores de pKa de 4.19, 4.31 y 4.87, respectivamente (Schwarzenbach *et al.*, 2003), estuvieran cargados negativamente, lo que podría haber favorecido dicha adsorción por fuerzas electrostáticas. La adsorción mediante este mecanismo también fue evidente ya que los grupos carboxílicos

alifáticos de la leonardita sulfonada, visibles a  $1700\text{ cm}^{-1}$ , desaparecen una vez esta se adsorbió en la resina Figura 8.9.

Cabe destacar que la naturaleza y características químicas de las soluciones y sólidos naturales difieren considerablemente (pH, condiciones redox etc.). Incluso diversas reacciones químicas, incluyendo la hidrólisis o reacciones redox, ocurren a diferente tasa en un estado de sorción y en comparación de un estado disuelto. Cuando se lleva a cabo la sorción en ambientes naturales, comúnmente no existe un intercambio entre una única solución homogénea y un sólo adsorbente homogéneo, sino será gobernado por una combinación de interacciones químicas entre el adsorbato y el adsorbente (Schwarzenbach *et al.*, 2003).

En cuanto a la desorción (Tabla 8.2), se observó un porcentaje por arriba del 15% de pérdida de COT adsorbido, cuando la resina estuvo en contacto con concentraciones iniciales bajas de COT ( $< 1000\text{ mg COT/L}$ ), mientras que en los demás ensayos donde la resina se expuso a concentraciones iniciales  $>1000\text{ mg COT/L}$ , el porcentaje de desorción fue menor al 5 %. Lo anterior puede ser atribuido a que, a bajas concentraciones iniciales de adsorbato, la afinidad entre el adsorbato y adsorbente es baja, lo que provoca que la interacción entre éstos sea débil.

Este comportamiento es evidente en el presente estudio ya que cuando la resina se expuso a un tratamiento de desorción, el porcentaje fue elevado en concentraciones iniciales bajas de LS en comparación de aquellos porcentajes cuando la resina estuvo expuesta a altas concentraciones iniciales de LS y por lo tanto, promovió una mayor interacción entre éste y el adsorbente. La forma tipo "S" de la isoterma corrobora dicho fenómeno, ya que se puede observar una mayor adsorción y menor desorción a altas concentraciones iniciales de LS y una baja adsorción y mayor desorción con bajas concentraciones iniciales de LS.

### 9.3 Experimentos en lote de bio-transformación de RR2 en presencia de LS disuelta y adsorbida en resina Amberjet y de 4NF en presencia de LS adsorbida en resina Amberjet

En este trabajo se presenta la aplicación de LS inmovilizada en una resina de intercambio iónico en la decoloración y transformación reductiva de RR2 y 4NF, respectivamente. El papel catalítico de la LS se vio reflejado en la tasa de decoloración de RR2, no así para la transformación de 4NF.

Las cinéticas de decoloración realizadas con 100, 50 y 25 mg COT /L mostraron que la LS inmovilizada conservó su capacidad catalítica. En estudios similares utilizando MR modelo y otros soportes se ha encontrado igualmente que los grupos encargados del transporte de electrones conservaron su capacidad catalítica una vez que habían sido inmovilizados (van der Zee et al, 2003; Ceballos, 2005, Guo *et al* 2007, Mezogehyi et al 2007 y García 2008). En el presente trabajo el tratamiento con mejor resultado fue el que contenía 100 mg COT-I/L mismo que aumentó en 2.5 veces la tasa de decoloración, de acuerdo a una cinética de segundo orden, respecto al control biológico sin sustancias húmicas.

Cabe mencionar que aunque en los otros estudios el impacto de los MR ha sido más significativo, existen diferentes combinaciones entre los tratamientos que deben ser tomadas en cuenta. Por ejemplo, la concentración inicial de colorante, la cantidad de SH o MR, el potencial redox, entre otros. Si bien es cierto que en el estudio realizado por García (2008) se alcanzó un aumento de hasta 3.8 veces en la tasa de decoloración de RR2 respecto al control sin resina cubierta de NQS, la cantidad de biomasa en el sistema fue de 30 g SSV/L, mientras que en el presente trabajo sólo se utilizó 0.1 g SSV/L; lo anterior, para evaluar mayormente el papel catalizador de la SH inmovilizada y no del microorganismo. Así mismo, al ser una quinona modelo la que está inmovilizada en el trabajo de García (2008), los grupos encargados de la transferencia de electrones se encuentran más disponibles que una sustancia húmica parental.

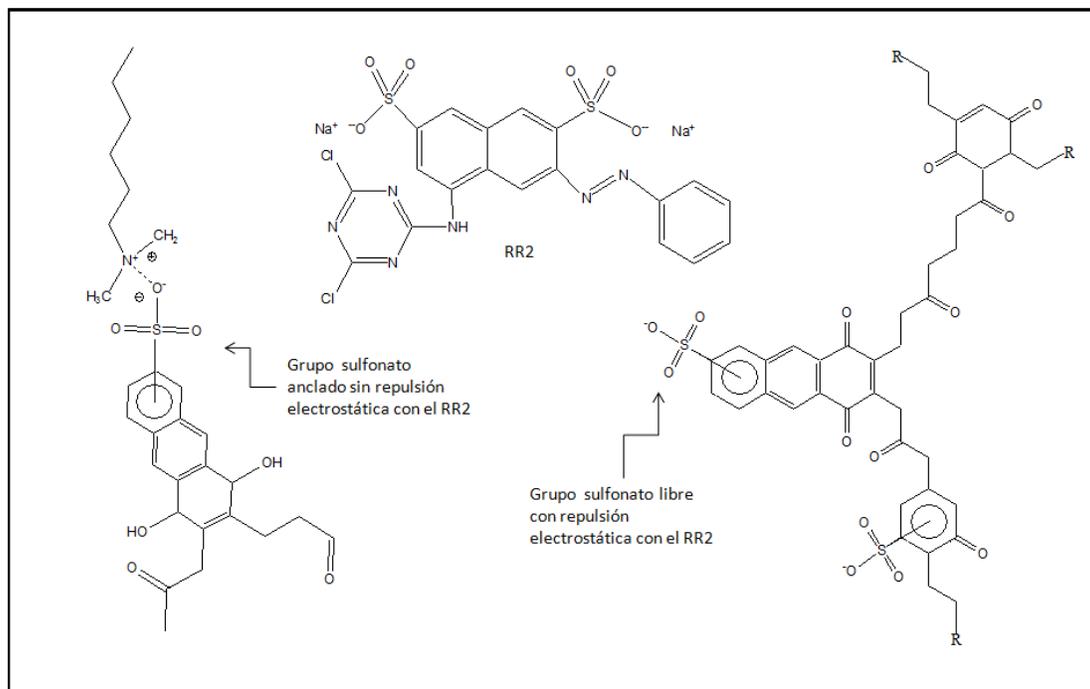
En el estudio de van der Zee *et al* (2003) se probó la capacidad aceptora de electrones del carbón activado (CA) por cultivos anaerobios. En el estudio se encontró que la presencia de un inhibidor de la actividad metanogénica tuvo efecto solamente en los cultivos que no contaban con el CA como aceptor de electrones. Además, en dicho estudio se evaluó la capacidad de mediación redox del CA en reactores UASB en la bio-transformación de RR2, en el cual se encontró que el CA contaba con una capacidad de mediación redox 120 veces mayor a la capacidad de adsorción de este mismo. El reactor que contenía CA eliminó 5.542 g de RR2 hidrolizado (de los cuales  $59.2 \pm 3$  mg pueden ser adjudicados al proceso de adsorción) después de 130 días, mientras que el reactor sin CA solamente eliminó 2.242 g de RR2 hidrolizado. Es decir, el reactor con CA eliminó 3 g más de RR2. El estudio anterior arroja dos conclusiones importantes: 1) los grupos quinona presentes en diferentes superficies naturales como el CA pueden ser reducidos por microorganismos anaerobios y transferir los electrones al colorante, sirviendo así como mediador redox y 2) la adsorción en flujo continuo contribuye a la eficiencia global del sistema de tratamiento.

En el presente estudio, se observó en la mayoría de los casos que LS contribuyó en el aumento de la tasa de bio-transformación del colorante; sin embargo, es de interés mencionar que en los ensayos particulares donde se evaluó 50 y 100 mg COT/L, LS inmovilizada mostró mayor poder catalítico en comparación con LS disuelta, lo cual podría ser explicado a través de la siguiente hipótesis:

Los experimentos fueron realizados a un pH 7 lo que provoca que la estructura de la LS, más específicamente sus grupos sulfonato, se encuentren cargados parcialmente negativos, (pKa del ácido sulfuroso  $pK_{a1}=1.76$  y  $pK_{a2}= 7.18$ ) lo que provocaría una repulsión electrostática con los grupos sulfato del colorante y con la superficie de los microorganismos. Así mismo, como se mencionó anteriormente, Yudov *et al* (2005), comprobó un incremento de grupos ácidos fuertes en la leonardita una vez que fue sulfonada, lo que indica de manera

directa que los grupos con carga negativa están en mayor cantidad cuando la SH fue sulfonada.

Aunado a esto, se debe hacer mención que la adsorción de SH en la resina Amberjet se llevó a cabo en un pH inicial de 7, lo que provocaría que los grupos sulfonatos de la LS, a ese pH, se encuentren cargados negativamente, y esto propició que se hayan intercambiado con los  $\text{Cl}^-$  de la resina, lo cual puede ser constatado por los espectros infrarrojos (Figura 8.8 y Figura 8.9). Lo anterior tendría como consecuencia que, al momento de realizar el experimento de bio-transformación en presencia de la resina cubierta de LS, dichos grupos sulfonato que estaban libres en la LS disuelta, se encuentren ligados a la resina, con lo cual la repulsión electrostática disminuiría dejando así más disponibles los grupos carbonilo e hidroxilo encargados de la transferencia de electrones (Figura 9.3).



**Figura 9.3** Interacción de RR2 con leonardita sulfonada disuelta e inmobilizada

Para comprobar lo anterior deben realizarse experimentos con un pH más ácido (dentro del umbral al cual los microorganismos anaerobios son activos) lo que provocaría que la leonardita sulfonada se comience a protonar con lo cual

disminuiría la repulsión electrostática, cabe destacar que bajo pH's ligeramente ácidos las especies difenolato y monofenolato encargadas en parte de la transferencia de electrones, disminuyen (van der Zee & Cervantes, 2009), por lo que deben realizarse pruebas con leonardita sin sulfonar tanto disuelta como inmovilizada lo que contestaría si los grupos sulfonatos serían los encargados de incrementar dicha repulsión entre las especies.

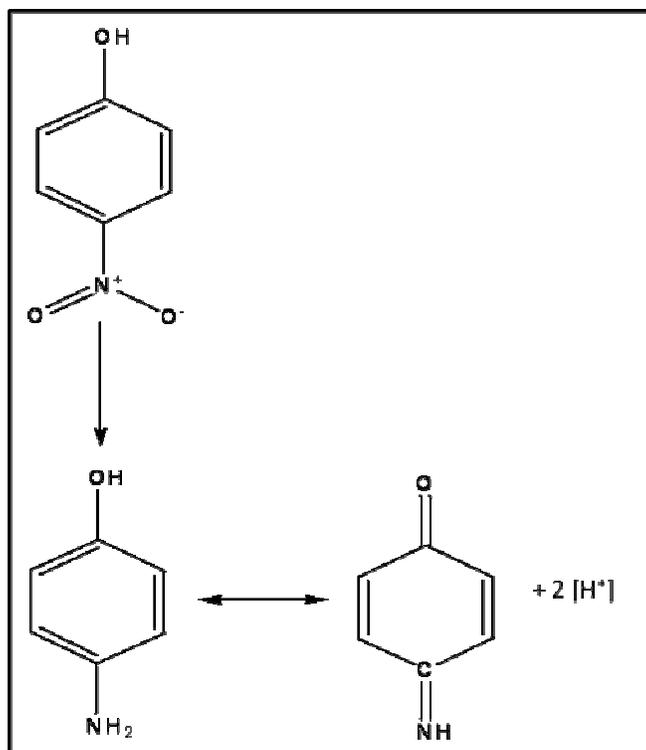
Por último, en cuanto al comportamiento de orden de reacción que exhibió la decoloración de RR2, es evidente el efecto que tuvo la LS en éste, tanto disuelta como inmovilizada. Cuando la LS estuvo presente en los tratamientos que contenían microorganismos la cinética se ajustó a un segundo orden de reacción lo que indica que además de la cantidad de colorante inicial y el aprovechamiento de la glucosa por parte de los microorganismos, existen otras especies proporcionadas por la LS, que pueden ser atribuidos a grupos quinona que intervinieron como mediadores redox. Mientras que en los controles biológicos sin LS, la reacción de decoloración siguió un primer orden, lo que indica que la transformación de RR2 sólo depende de la concentración inicial de este contaminante.

En cuanto a la transformación reductiva de 4NF, no se observó un efecto positivo cuando se agregó la resina con SH; lo cual puede estar inducido por la concentración de 1.2 mM de 4NF a la que fue expuesta la resina para alcanzar el equilibrio antes de comenzar con la bio-transformación. Cabe destacar que en el estudio realizado por Razo-Flores (1997) se encontró una inhibición de la actividad metanogénica del 80% con una concentración 0.2 mM de 4NF; lo anterior, podría indicar que el sistema adquirió una concentración de 4NF lo suficientemente alta como para inactivar al consorcio anaerobio.

Además de dicha inhibición por concentración, otra posible causa que pudo provocar un efecto nulo e incluso adverso en presencia de las resinas cubiertas con SH sobre la bio-transformación de 4NF, fue la formación de una capa de 4NF

sobre la resina cubierta con LS. Es decir en los experimentos con 25 mg COT/L y 50 mg COT/L se adsorbieron, antes de que se inocularan los microorganismos, 0.74 mM g<sup>-1</sup> y 0.40 mM g<sup>-1</sup> LS- resina intercambio iónico, respectivamente. Lo anterior pudo haber provocado, que desde el inicio de la reducción biológica, la leonardita no estuviera disponible para realizar el acarreamiento de electrones.

En cuanto al orden de reacción, se observó que todos los tratamientos del experimento con 4NF obedecen a un segundo orden de reacción. Como se explicó anteriormente, en los experimentos de RR2, la presencia de LS contribuye a que existan especies que influyan en que la reacción no sólo dependa de la concentración inicial del contaminante. Sin embargo, en este caso el control biológico sin LS, presenta igualmente un mejor ajuste a un segundo orden, lo que indica que su bio-transformación reductiva no sólo depende de la concentración inicial de 4NF. Es decir en la reducción de 4NF interviene otro reactivo que afecta la cinética, lo anterior podría ser explicado por una auto-catálisis del 4NF propiciada por la reacción de equilibrio del 4-aminofenol, producto de la reducción de 4NF, y su respectiva amino quinona, la cual actuaría como mediador redox propiciando una auto-catálisis. En el trabajo de van der Zee (2002) se observó un fenómeno similar de auto-catálisis en la reducción del colorante naranja ácido 7 inducida por la amino quinona generada durante la reducción microbiana de dicho contaminante. El mecanismo de una posible auto-catálisis de 4 NF se esquematiza en la Figura 9.4.



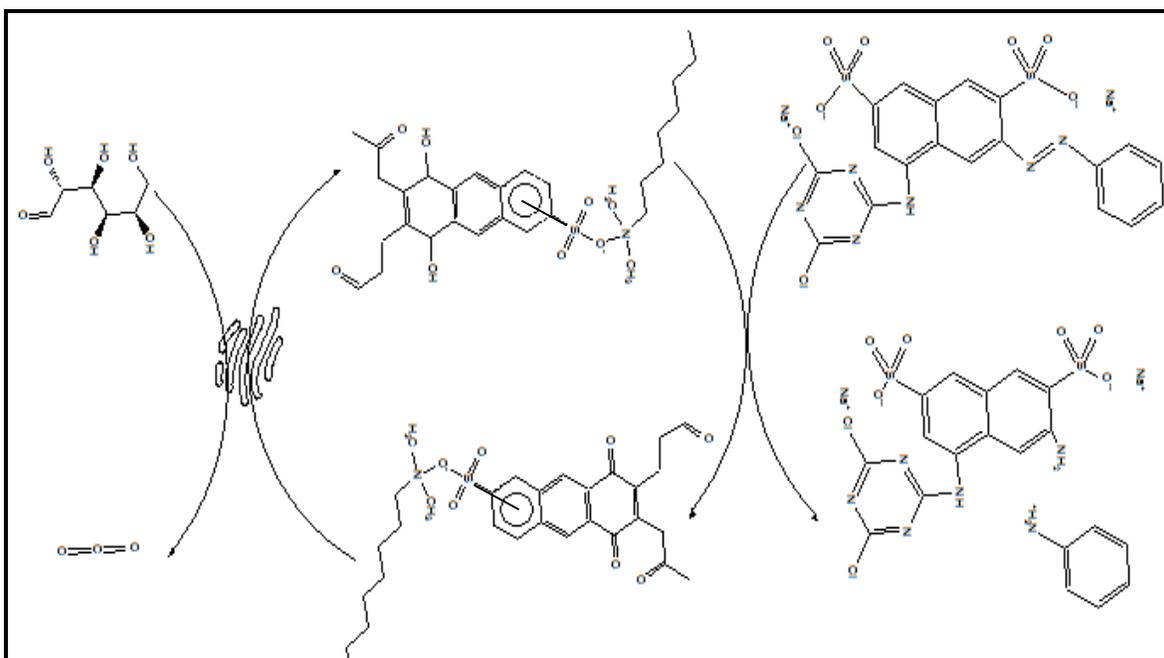
**Figura 9.4** Auto-catálisis de 4 NF propiciada por el equilibrio 4 amino-fenol y 4 amino quinona.

En cuanto a los inconvenientes encontrados a causa de la afinidad de la resina cubierta con LS hacia los contaminantes podrían ser sólo una desventaja para realizar las mediciones sin interferencia en estudios en lote. No obstante, para un flujo continuo, donde ocurriría la adsorción de los contaminantes, por un lado, se evitaría que parte del contaminante escape al tratamiento y por otro, daría más tiempo al microorganismo para que aproveche el sustrato y puede reducir tanto al 4NF como al RR2 en presencia de SH inmovilizadas.

Como se puede ver en las Tablas 3.1 y 3.2, se ha reportado que la presencia de quinonas modelo y SH han tenido un efecto positivo en la bio-transformación de colorantes azo y compuestos nitro-aromáticos; sin embargo, su uso se ha visto limitado debido a la dosificación continua que requiere en reactores anaerobios. Lo anterior se ha empezado a resolver mediante la inmovilización de los MR en diferentes matrices con resultados positivos; no obstante, la utilización de MR

modelo incrementa el costo por gramo de material, lo cual es un inconveniente para que su manejo a escala piloto e industrial pueda ser factible.

Como se pudo demostrar en este trabajo, al utilizar SH inmobilizadas parentales se mantiene la actividad catalítica, lo cual es una ventaja al anterior inconveniente. Además, es necesario mencionar que, hasta este momento, este es el primer trabajo que reporta la utilización de SH inmobilizadas con el fin de aprovechar sus características catalíticas en la bio-transformación de un compuesto nitro-aromático y un colorante azo. El mecanismo de transferencia de electrones en presencia de SH inmobilizada en resina amberjet se esquematiza en la Figura 9.5.



**Figura 9.5** Mecanismo de reducción de RR2 en presencia de leonardita sulfonada inmobilizada en una resina de intercambio iónico la cual funciona como mediador redox aceptando los electrones de la glucosa, oxidada por los microorganismos, y transfiriéndolos al enlace azo del RR2 propiciando por una lado su reducción y por otro la formación de una amina aromática.

## 10 Conclusiones y actividades futuras

Mediante el proceso de sulfonación de leonardita se incrementó evidentemente la solubilidad de ésta en términos de mg COT/L. Las pruebas de solubilidad realizadas a leonardita sulfonada permitieron establecer un método con el que se pudieron realizar los experimentos con una fracción de humus más homogénea, lo cual resultó en conocer precisamente cuánta LS en términos de COT fue aplicada en los experimentos posteriores. Cabe destacar que una de las contribuciones más importantes de este trabajo es sin duda la metodología para disolver la SH y el diseño experimental desarrollado con el cual se pueden obtener concentraciones muy cercanas a las esperadas teóricamente.

Los experimentos de adsorción mostraron que el intercambio iónico entre la leonardita sulfonada y el  $\text{Cl}^-$  de la resina Amberjet fue factible. La información obtenida partir de la espectroscopia de infrarrojo indica que el enlace entre la leonardita y la resina, se lleva a cabo a través tanto del grupo  $\text{SO}_3\text{H}$  añadido como por los grupos  $\text{OH}^-$  de la leonardita. Así mismo, los experimentos de desorción indican que el enlace entre la leonardita sulfonada y la resina es robusto y lo suficientemente fuerte para no perder sustancia húmica en el tratamiento de un compuesto aromático nitrogenado, lo cual fue confirmado en las cinéticas de decoloración. Por lo que el presente estudio indica que la sulfonación de las sustancias húmicas, con el propósito de hacerlas más afines a matrices poliméricas, es una metodología que permite realizar la adsorción de éstas sin afectar sus propiedades catalíticas

En cuanto a las pruebas de bio-transformación, el trabajo presenta resultados alentadores en cuanto a la utilización de SH inmovilizadas en la bio-transformación de compuestos aromáticos nitrogenados. Se comprobó que la aplicación de SH inmovilizadas, en la bio-transformación de RR2, contribuye en el aumento de la tasa de decoloración en 2.5 veces respecto al control sin SH, lo cual indica que, a

pesar del proceso de inmovilización, los grupos quinona presentes en la LS aceleran la transferencia de electrones en la reacción.

No obstante, se pudo observar que la capacidad catalítica de la leonardita se vio afectada por la afinidad de la resina de intercambio iónico hacia el 4NF, por lo que impidió evaluar el efecto de una sustancia húmica inmovilizada en la biotransformación de un nitro-aromático. Sin embargo, es evidente que la biotransformación de 4NF en ausencia de mediadores redox aún con una baja concentración de biomasa (0.1 g SSV/L) es factible.

Es preciso mencionar que son necesarios más estudios que permitan evaluar la capacidad de leonardita sin sulfonar para adsorberse en resinas de intercambio iónico. Igualmente, es de interés realizar pruebas de adsorción de leonardita sulfonada y sin sulfonar en diferentes soportes. Además, es necesario seguir explorando diferentes condiciones en la bio-transformación de 4-NF en presencia de leonardita y, finalmente, examinar la eficiencia de las sustancias húmicas inmovilizadas bajo condiciones de flujo continuo en la bio-transformación de contaminantes aromáticos nitrogenados.

## 11 Referencias.

- Albuquerque MGE, Lopes AT, Serralheiro ML, Novais JM, Pinheiro HM. **Biological sulphate reduction and redox mediator effects on azo dye decolourisation in anaerobic–aerobic sequencing batch reactors.** Enzyme Microb Technol 2005; 36:790–9.
- Borch T, Inskeep WP, Harwood JA, Gerlach R. (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.; 39:7126–33.
- Bhushan B, Halasz A, Hawari J. (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
- Cervantes; F. J., Van der Velde, Lettinga G. y Field J.A. (2000) **Quinones as terminal acceptors for anaerobic microbial oxidation of phenolic compounds.** Biodegradation 11:313- 321
- Cervantes, F. J., Wouter D., Tuan D. D., Ivanova A.; Lettinga G. y Field J.A.. (2001) **Anaerobic Mineralization of Toluene by Enriched Sediments with Quinones and Humus Terminal Electron Acceptors.** Appl. Environ. Microbiol 67(10):4471-4478,
- Cervantes F. J., L Vu Thi-Thu, Lettinga G., Field J.A. (2004) **Quinone-respiration improves dechlorination of carbon tetrachloride by anaerobic sludge.** Environ. Microbiol. 64: 702-711
- Cervantes FJ, Enriquez JE, Mendoza Hernandez MR, Razo-Flores E, Field JA. (2006) **The role of sulphate reduction on the reductive decolorization of the azo dye reactive orange** Water Sci. Technol., 54:171–7.
- Ceballos, Karla (2005). **Inmovilización de mediadores redox en carbón activado.** Tesis de licenciatura Instituto Tecnológico de Sonora
- Curtis P. y Reinhard M. (1994) **Reductive Dehalogenation of Hexachloroethane, Carbon Tetrachloride, and Bromoform by**

- Anthrahydroquinone Disulfonate and Humic Acid** Environ Sci. Technol., 28: 2393-2401
- dos Santos A. B., Traverse J., Cervantes F. J. y Van Lier J. B. (2004) **Enhancing the electron transfer capacity and subsequent color removal in bioreactors by applying thermophilic anaerobic treatment and redox mediators.** Biotechnol. Bioeng., 89, 42-52, 2005c.
  - dos Santos A. B., de Madrid M. P., Stams Alfons J. M., van Lier Jules B., Cervantes F. J. (2005) **Azo Dye Reduction by Mesophilic and Thermophilic Anaerobic Consortia** Biotechnol. Prog., 21 (4), 1140 -1145
  - Dunnivant, F.M. Schwarzenbach, R.P. and Macalady, D.L. (1992) **Reduction of substituted nitrobenzenes in aqueous solutions containing natural organic matter.** Environ Sci Technol. 26:2133-2142
  - Field J. A. y Brady J. (2003) **Riboflavin as a redox mediator accelerating the reduction of the azo dye Mordant Yellow 10 by anaerobic granular sludge.** *Water Sci. Technol.* 48, 187-193,.
  - Field, J. A. Cervantes F. J.; van der Zee F.P y Lettinga G. (2000).**Role of quinones in the biodegradation of priority pollutants: a review.** Water Sci Technol. 42 5-6:215-222
  - Field JA, Cervantes FJ. **Microbial redox reactions mediated by humus and structurally related quinones. (2005)** En: Perminova IV, Hatfield K, Hertkorn N, editors. **Use of humic substances to remediate polluted environments: from theory to practice**, vol. 52. Dordrecht, The Netherlands: Springer; p. 343–52.
  - Fu Yueping and Weiss R.A. (1997) **Protonation of polyaniline with lightly sulfonated polystyrene.** Synth. Met., 84(1-3):103-104
  - García E., Alberto. (2008) **Inmovilización de mediadores redox en matrices poliméricas y su aplicación en la biotransformación reductiva de un colorante azo.** Tesis de Maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. San Luis Potosí, México.

- Gu, B.; Schmitt, J.; Chen, Z.; Liang, L.; McCarthy (1994) **Adsorption and desorption of natural organic matter on iron oxide: mechanisms and models**, *J. F. Environ. Sci. Technol.*, 28: 38–46.
- Guo J., Zhou J., Wang D., Tian C., Wang P., Uddin M. Salah Y. H- **Biocatalyst effects of immobilized anthraquinone on the anaerobic reduction of azo dyes by the salt tolerant bacteria** *Water Res.*, 41: 426-432
- Haas, R., I. Schreiber, E. von Löw, and G. Stork. 1990. **Conception for the investigation of contaminated munitions plants. 2. Investigation of former RDX-plants and filling stations**. *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 338:41-45.
- Hakala JA, Chin Y-P, Weber EJ. (2007) **Influence of dissolved organic matter and Fe(II) on the abiotic reduction of pentachloronitrobenzene**. *Environ Sci Technol* ;41:7337–42
- Hofstetter T. B., Heijman C. G., Haderlein S. B., Holliger C. and Swarzenbach R. P. (1999) **Complete reduction of TNT and other (poly)nitroaromatic compounds under iron-reducing subsurface conditions**. *Environ. Sci. Technol.* 33: 1479-1487
- Hong YG, Gu J, Xu ZC, Xu MY, Sun GP (2007). **Humic substances act as electron acceptor and redox mediator for microbial dissimilatory azoreduction by *Shewanella decolorationis* S12**. *J Microbiol Biotechnol.* 17: 428–37.
- Horber, C., Christensen N, Arvin E. (1999) **Tetrachloroethen dechlorination kinetics by *dehalospirillum multivorans* immobilized in upflow anaerobic sludge blanket**. *Appl Microbiol Biotechnol.* 51:694-699
- Keum YS & Li QX. (2004) Reduction of nitroaromatic pesticides with zero-valent iron. *Chemosphere.* 54: 255-263
- Klavins Maris & Apsite Elga. (1997) **Immobilization of humic substances IJSS Polish Society of humic substances** 53: 50-357
- Klavins M., Eglite L, Zicmanis A (2006) **Immobilized humic substances as sorbents**. *Chemosphere* 62:1500-1506
- Kudlich M, Keck A, Klein J, Stolz A. (1997) **Localization of the enzyme system involves 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.
- Kwon M. J. & Finneran K. T. (2006) **Microbially mediated biodegradation of Hexahydro-1, 3, 5 – trinitro- 1,3,5- triazine by extracellular electron shuttling compounds.** Appl Environ Microbiol 72(9):5933-5941
  - Kwon M, Finneran K. (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. 19:705–15.
  - Liu Aiguo & Gonzalez Richard D. (2000) **Modeling Adsorption of Copper(II), Cadmium(II) and Lead(II) on Purified Humic Acid** Langmuir, 16 (8), pp 3902–3909
  - Lovley, D R., Fraga J. L., Coates J. D & Blunt-Harris E. L. (1999) **Humics as an electron donor for anaerobic respiration.** Environ Microbiol 1:89-98
  - Manahan S E. Environmental Chemistry Lewis Publishers 7 Ed 741-742 (2000)
  - Marozienne A, Kliukiene R, Saarlauskas J, Cenas N (2001) **Methemoglobin formation in human erythrocytes by nitroaromatic explosives.** Z Naturforsch 56: 1157-63
  - Márquez-Pavón, A. (2009) **Aspectos cinéticos en la biotransformación reductiva de solventes polihalogenados en presencia de mediadores redox inmovilizados.** Tesis de maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. San Luis Potosí. México
  - Martins, C.R., Ruggeri, G. & De Paol, M. A. (2003) **Synthesis in Pilot Plant Scale and Physical Properties of Sulfonated Polystyrene** J. Braz. Chem. Soc., 14( 5): 797-802
  - Mendoza-Macías, González-Estrella J. Blanca, Pérez-Cruz M.A. Cervantes F.J. (2008) **Efecto de la concentración de ácidos húmicos en la reducción de 4-Nitrofenol Por Un Lodo Metanogénico.** En poster XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería Acapulco. México.
  - Mezohegy G., Kolodkin A., Castro U. I., Bengoa C., Stuber F., Font J., Fabregat A. (2007) **Effective anaerobic decolorization af azo dye acid**

- orange 7 in continuous upflow packed bed reactor using biological activated carbon system** Ind. Eng. Chem. Res. 46, 6788-6792, 2007.
- O'Loughlin, E. J. (2008). **Effects of electron transfer mediators on the bioreduction of lepidocrocite ( $\gamma$ -FeOOH) by *Shewanella putrefaciens* CN32.** Environ. Sci. Technol. 42(18):6876-6882.
  - O'Neill C., Lopez A. Esteves S., Hawkes F.R., Hawkes D.L. Wilcox S.J. (2000) **Azodye degradation in anaerobic-aerobic treatment system on a simulated textile effluent.** Appl Microbiol Biotechnol 53: 249-254
  - Peng S., Ma M., Jin S., Chen T. (2009) **Kinetics of p-Nitrophenol Adsorption by Layered Double Oxides During Its Hydration** Wat. Environ. Res. 81(1): 91-96
  - Rajaguru P., Kalaiselvi K, Palanivel M.y Suburaman V. (2000) **Biodegradation of azo dyes in a sequential anaerobic-aerobic system.** Appl Microbiol Biotechnol 54:268-273
  - Rau J, Knackmuss HJ, Stolz A. (2002) **Effects of different quinoid redox mediators on the anaerobic reduction of azo dyes by bacteria.** Environ Sci Technol; 36: 1497–504.
  - Razo Flores, E., Luijten M., Donlon B A, Lettinga G., y Field J.A (1997) **Complete Biodegradation of the Azo Dye Azodisalicylate under Anaerobic Conditions** Environ. Sci Technol 31 (7): 2098 -2103
  - Razo Flores E. (1997) **Biotransformation and biodegradation of N-substituted aromatics in methanogenic granular sludge.** PhD Thesis Wageningen Agricultural Thesis, The Netherlands
  - Rittmann B & Mccarty P. L. (2001) **Environmental Biotechnology: Principles and Applications** Mc Graw-Hill: Series in water resources and environmental engineering. Boston, USA.
  - Ryon MG, Ross RH (1990) **Water quality criteria for 2, 4, 6, trinitrotoluene Regul Toxicol Pharmacol** 11: 104-13
  - Silverstein, M. R. & Francis X. W. (1992) **Spectrometric identification of organic compounds** 6<sup>ta</sup> edición. John Wiley & Sons Inc New York, USA.

- Sirpa Kumpulainen, Frank von der Kammerb and Thilo Hofmannb 2007 **Humic Acid adsorption and surface charge effects on schwertmannite and goethite in acid sulphate waters** 42(8-9): 2051-2060
- Spain J.C (1995) **Biodegradation of Nitroaromatic Compounds**. Annu. Rev. Microbiol 49: 523-555
- Sposito, G. **The Surface Chemistry of Soils**; Oxford University Press: New York, 1984.
- Schwarzenbach, R.P., Gschwend, M.P., Imboden M.D. (2003) **Environmental Organic Chemistry 2ed**. pp: 275-331, 1206. Wiley-Interscience USA.
- Schwarzenbach, R.P., Stierli R., Lanz, K., Zeyer, J. (1990) **Quinone and iron porphyrin mediated reduction of nitroaromatic compounds in homogeneous aqueous solution** Environ. Sci Technol., 24:1566-1574
- Stevenson F.J (1994) **Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions** 2ed. pp 215-234 John Wiley Illinois, USA.
- Talmage SS, Opresko DM, Maxwell CJ, Welsh CJ, Cretella FM, Reno PH, Daniel FB (1999) **Nitroaromatic munition compounds: Environmental effects and screening values**. Rev Environ Contam Toxicol; 161: 1-156
- Tratnyek PG, Macalady DL. (1989) **Abiotic reduction of nitro aromatic pesticides in anaerobic laboratory systems**. J Agric Food Chem; 37:248–54.
- U.S Environmental Protection Agency (2004). **Edition of the drinking water standard and health advisors**. U.S. Environmental Protection Agency. Washington D.C.
- van der Zee (2002) **Anerobic azo dye reduction**. PhD Thesis Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.
- van der Zee, F.P., Bisschops, I. A. E. y Lettinga, G (2003) **Activated carbon as an electrón acceptor and redox mediator during the anerobic transformation of azo dyes** Environ Sci Technol. 37: 402-408
- van der Zee FP, Bouwman RHM, Strik DPBTB, Lettinga G, Field JA. (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. & Cervantes F.J. (2009) **Impact and application of electron shuttles on the redox (bio)transformation of contaminants: A review,** *Biotechnol. Adv.* 27, 256-277
  - van der Zee F. P., Lettinga G. and Field J. A. (2000) **The role of (auto)catalysis in the mechanism of anaerobic azo reduction.** *Water Sci. Technol.* 42: 301-308
  - Williford C.W., Bricka R.M. (1999) **Extraction of TNT from aggregate soil fractions.** *J Hazard Mater* 66: 1-13
  - Yang Kun, Daohui Lin, and Baoshan Xing (2009) **Interactions of Humic Acid with Nanosized Inorganic Oxides** 25 (6), 3571-3576
  - Yudov M.V., Zhilin D.M., Pankova, A.P. Rusanov A.G., Periminova I.V, Petrosyan V.S., Matorin D.N. (2005) **Synthesis, Metal-Binding properties and detoxifying ability of sulphonated humic acids.** En Perminova IV, Hatfield K, Hertkorn N, editors. **Use of humic substances to remediate polluted environments: from theory to practice**, vol. 52. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2005. p. 485–98