

---

---

## ÍNDICE

	Página
<b>RESUMEN.....</b>	<b>i</b>
<b>ÍNDICE.....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Planteamiento del problema.....	4
1.3 Justificación.....	6
1.4 Objetivo.....	7
1.5 Limitaciones.....	8
<b>II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA</b>	
2.1 Desnitrificación .....	9
2.2 Propiedades catalíticas del Humus.....	11
2.3 Eliminación simultanea de Carbono, Nitrógeno y Azufre	17
<b>III. METODOLOGÍA</b>	
3.1 Tipo de investigación.....	20
3.2 Ubicación del experimento.....	20
3.3 Materiales y reactivos.....	20
3.3.1 Materiales.....	21
3.3.2 Reactivos .....	21

3.4	Etapa experimental .....	21
	3.4.1 Preparación de soluciones.....	21
3.5	Técnicas analíticas.....	23

#### **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4.1	Curvas de calibración .....	24
4.2	Reducción de AQDS.....	26
4.3	Reducción de lawsona.....	27
4.4	Reducción de naftoquinona.....	27

#### **V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

#### **REVISION BIBLIOGRÁFICA**



---

---

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1 Valores requeridos para realizar una curva de calibración para AQDS.....	22
2 Valores requeridos para realizar curvas de calibración para naftoquinona y lawsona .....	23

---

---

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1 Oxidación de acetato por microorganismos reductores del humus (MRH) acoplado a la reducción de óxidos férricos en la que participan las quinonas como transportadores de electrones.....	13
2 Mecanismo de reducción de colorantes azo a través del compuesto modelo AQDS (2,6-disulfonato de antraquinona).....	16
3 Curva de calibración de AQDS ( $\lambda=340$ ). Los resultados son las medias de ensayos por triplicado.....	25
4 Curva de calibración de lawsona ( $\lambda=340$ ).....	25
5 Curva de calibración de naftoquinona ( $\lambda=346$ ).....	26
6 Reducción de AQDS.....	26
7 Reducción de lawsona .....	27
8 Reducción de naftoquinona .....	28

---

---

## RESUMEN

Se considera como contaminante, al exceso de materia o energía (calor) que causa daño a los humanos, animales, plantas y bienes, o bien que perturbe negativamente las actividades que normalmente se desarrollan cerca o dentro del ecosistema.

En nuestras sociedades el petróleo y sus derivados son imprescindibles como fuente de energía y para la fabricación de múltiples productos de la industria química, farmacéutica, alimenticia, etc, además es un recurso natural no renovable que aporta el mayor porcentaje del total de la energía que se consume en el mundo.

Los vertidos de petróleo representan un grave problema, ya que una vez producidos, es casi imposible eliminarlos o contenerlos por completo

La presencia de concentraciones altas de nitrógeno demanda un proceso de nitrificación-desnitrificación para descontaminar este tipo de efluentes. No obstante, la presencia de compuestos aromáticos recalcitrantes en estos efluentes puede afectar la velocidad de la nitrificación y de la desnitrificación, por eso surge la necesidad de plantear y experimentar un sistema de tratamiento de aguas residuales a nivel laboratorio, que utiliza quinonas como es el caso de 2,6-disulfonato de antraquinona (AQDS), 1,4-Naftoquinona (Lawsona), sodio-1,2-Naftoquinona-4-sulfato para la reducción de este tipo de contaminantes.

Existen evidencias que indican que las quinonas, compuestos muy abundantes en el humus y la materia orgánica de suelos y sedimentos, pueden jugar un papel importante en la transformación de diferentes contaminantes bajo condiciones anaerobias, ya que pueden actuar como aceptores de electrones o como mediadores de óxido-reducción.

---

Para realizar el proceso de reducción de las diferentes quinonas se llevó a cabo primeramente la elaboración de curvas de patrón para cada una de las quinonas, continuando con un experimento en el cual se redujeron las quinonas con sulfuro. Los resultados indican que hubo una adecuada reducción por lo tanto pueden contribuir a su transformación a azufre elemental.

De las quinonas empleadas (AQDS, lawsona y NQ) en esta investigación, la lawsona presentó una mayor velocidad de reducción con sulfuro, por lo tanto recomienda su uso en el tratamiento de aguas residuales generadas por la refinería de petróleo.

---

---

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

Se considera como contaminante, al exceso de materia o energía (calor) que causa daño a los humanos, animales, plantas y bienes, o bien que perturbe negativamente las actividades que normalmente se desarrollan cerca o dentro de un ecosistema.

Un tóxico es cualquier sustancia química capaz de causar daño, debilitar o matar a cualquier organismo vivo. Los efectos que produce son en función del tipo de sustancia, concentración y metabolismo. En general, son teratogénicas (que producen anomalías en plantas y animales), mutagénicas, cancerígenas o venenosas. Una característica relevante es que son acumuladas, y su efecto se manifiesta sólo después de un cierto periodo de exposición (Jiménez,2002).

En nuestras sociedades el petróleo y sus derivados son imprescindibles como fuente de energía y para la fabricación de múltiples productos de la industria química, farmacéutica, alimenticia, etc. (Cervantes , 1999)



La presencia de concentraciones altas de nitrógeno en las aguas residuales, como las aguas amargas generadas por las refinerías de petróleo y los efluentes de tanería, demandan un proceso de nitrificación-desnitrificación para descontaminar este tipo de efluentes. No obstante, la presencia de compuestos aromáticos recalcitrantes en estos efluentes puede afectar la velocidad de la nitrificación y de la desnitrificación. Sin embargo, recientemente se encontró que compuestos aromáticos, como el *p*-cresol y el benceno, pueden ser transformados en un cultivo nitrificante (Texier *et al.*, 2002). Además, existen evidencias que indican que compuestos recalcitrantes, como el tolueno, pueden ser mineralizados en procesos desnitrificantes (Elmen *et al.* 1997; Cervantes *et al.* 2001a). Sin embargo, es aún poca la información existente que permita afirmar si la nitrificación tolera altas concentraciones de compuestos fenólicos.

El sulfuro es muy tóxico para una enorme gama de microorganismos, además de que produce olores en extremo desagradables en la forma del gas  $H_2S$ . La concentración de sulfuro puede llegar a superar los 500 ppm en las aguas residuales de las refinerías petroleras y está alrededor de 30 ppm en los efluentes de tanerías. Durante la nitrificación, el sulfuro puede ser oxidado a sulfato, pero el proceso nitrificante se ve negativamente afectado. Para la eliminación real del sulfuro debe hacerse en forma de azufre (y no en forma de sulfato), el cual es insoluble en agua. Hay algunas evidencias que indican que la eliminación de sulfuro de hidrógeno puede llevarse a cabo mediante procesos biológicos y bajo condiciones de aireación parcial, siendo el azufre elemental el producto final (Sublette, 1987). El problema que podría observarse, es el control del oxígeno a bajas concentraciones. Otra alternativa para la eliminación biológica del azufre, es por medio de la desnitrificación (proceso anaerobio) litoautotrófica en condiciones alcalinas, en donde el sulfuro actúa como donador de electrones para reducir el nitrato a nitrógeno molecular y el sulfuro se oxida a sulfato, aunque mediante el manejo estequiométrico de la relación Azufre/Nitrógeno en el proceso biológico, el producto final puede ser azufre

elemental y  $N_2$  (Gommers *et al.*, 1988). Se cuentan con evidencias recientes que muestran que la eliminación del sulfuro y nitrato puede llevarse a cabo con una eficacia aceptable, aun en presencia de materia orgánica, con lo cual se eliminan eficaz y simultáneamente S, N y C (Reyes-Avila *et al.*, 2000). No obstante, los mecanismos que permitan entender el fenómeno no están aún debidamente descritos.

Como puede verse todo lo anterior, sugiere que el proceso desnitrificante parece ser más amigable con la naturaleza que el proceso metanogénico, puesto que con el primero se forma  $N_2$  y  $CO_2$ , en tanto que en la metanogénesis se forma metano (que si no se almacena -lo que requiere de grandes inversiones-, y se usa como combustible, cuando se libera a la atmósfera, produce el efecto invernadero). Además, en la metanogénesis, el amonio se acumula, por lo tanto persiste el problema de la eutroficación. La ventaja de la desnitrificación, entonces, es que pueden ser eliminados nitrógeno, carbono (mediante  $N_2$  y  $CO_2$ , respectivamente) y azufre (elemental) mediante este proceso fisiológico respiratorio. Durante la desnitrificación se puede acumular nitrito y óxido nitroso, pero con un control adecuado de las relaciones C/N y S/N, así como de otros parámetros, se puede evitar (Cuervo-Lopez *et al.*, 1999; Cervantes *et al.*, 1998).

El transporte de electrones en procesos de eliminación simultánea de N, S y compuestos recalcitrantes por medio de procesos desnitrificantes no ha sido todavía bien definido, aún cuando su entendimiento permitirá optimizar los procesos biológicos involucrados. Por lo tanto, es necesario realizar estudios encaminados a elucidar los mecanismos por medio de los cuales los procesos desnitrificantes pueden lograr una óptima eliminación simultánea de N y S. Con lo anterior, se permitirá identificar los parámetros operacionales que permitan optimizar los procesos biológicos de tratamiento de aguas residuales con las características descritas anteriormente.

---

---

Recientes evidencias reportan que el rol de componentes húmicos en la transferencia de electrones bajo condiciones anaeróbicas muestran que estos compuestos están involucrados principalmente en 4 diferentes fenómenos:

- 1) Sirven como aceptores terminales de electrones para la oxidación anaeróbica de compuestos biodegradables y contaminantes prioritarios. Los óxidos metálicos pueden reciclar las sustancias húmicas reducidas.
- 2) Sirven como mediadores redox en la biotransformación reductiva de contaminantes prioritarios como los compuestos polihalogenados, nitro-aromáticos, colorantes azo y radionucleótidos.
- 3) Sirven como donadores de electrones para la respiración anaerobia de compuestos más oxidados como son nitrato, fumarato y perclorato.
- 4) Quelan metales para mejorar sus propiedades catalíticas como es la reducción de componentes polihalogenados por complejos humus-metal. (Field, J., *et al.* 2000)

## **1.2 Planteamiento del problema**

Del petróleo se dice que es el energético más importante en la historia de la humanidad; un recurso natural no renovable que aporta el mayor porcentaje del total de la energía que se consume en el mundo.

Los vertidos de petróleo representan un grave problema, ya que una vez producidos, es casi imposible eliminarlos o contenerlos por completo.

Dado que el agua y el petróleo no se mezclan, éste flota sobre el agua y acaba contaminando las costas. Dentro de los contaminantes más importantes en las aguas amargas de las refinerías de petróleo se encuentran aceites, materia orgánica, fenoles, amoníaco y sulfuros.

---

---

El sulfuro es la combinación del azufre (número de oxidación -2) con un elemento químico o con un radical. Hay unos pocos compuestos covalentes del azufre, como el disulfuro de carbono ( $\text{CS}_2$ ) y el sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ) que son también considerados como sulfuros.

Uno de los sulfuros más importantes es el de hidrógeno. Este compuesto es un gas con olor a huevos podridos y es altamente tóxico. Pertenece también a la categoría de los ácidos por lo que, en disolución acuosa, se le denomina ácido sulfhídrico. En la Naturaleza, se forma en las zonas pantanosas y en el tratamiento de lodos de aguas residuales, mediante transformaciones anaeróbicas del azufre contenido en las proteínas o bien por reducción bacteriana de sulfatos. Se desprende también en las emisiones gaseosas de algunos volcanes y es asimismo un subproducto de algunos procesos industriales.

Muchos sulfuros son significativamente tóxicos por inhalación o ingestión, especialmente si el ión metálico es tóxico. Por otro lado, muchos sulfuros, cuando se exponen a la acción de un ácido mineral fuerte, liberan sulfuro de hidrógeno.

A niveles muy altos, el sulfuro de carbono puede ser fatal debido a sus efectos sobre el sistema nervioso. Estudios en animales indican que el sulfuro de carbono puede perjudicar el funcionamiento normal del cerebro, el hígado y el corazón. El contacto accidental de la piel con concentraciones altas de sulfuro de carbono ha producido quemaduras.

El sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ) es un claro ejemplo de compuesto altamente problemático que es fácilmente tratable mediante sistemas biológicos. El sulfuro de

---

---

hidrógeno se genera esencialmente en procesos industriales como el refinado de petróleo, la fabricación de papel y pulpa de papel, el procesado de alimentos y en el tratamiento de gas natural y otros combustibles. Asimismo, es uno de los principales productos generados en los colectores de las plantas depuradoras de aguas residuales urbanas y forma parte de la mayoría de los olores generados en otras zonas de las industrias de tratamiento de residuos. (C. Kennes and M.C. Veiga, 2001).

La reducción de las diferentes quinonas empleadas en este estudio para oxidar el sulfuro permite explorar un mecanismo de depuración para lograr un mejor tratamiento del sulfuro presente en las aguas amargas generadas por las refinerías de petróleo.

### **1.3 Justificación**

El agua puede contaminarse de diversas maneras, con sustancias químicas orgánicas e inorgánicas, alterando o modificando sus características originales. Desafortunadamente es el mismo hombre quien ha abusado de las aguas del planeta, utilizándolas como vehículo de sus desechos, de tal forma que sus actividades han ido degradando paulatinamente el medio ambiente acuático (Novaro, 1998).

Meltca y Eddy (1996) indican que si se permite la acumulación y estancamiento del agua residual, la descomposición de la materia orgánica que contiene puede conducir a la generación de grandes cantidades de compuestos malolientes. A este hecho cabe añadir la frecuente presencia en el agua residual bruta, de numerosos microorganismos patógenos y causantes de enfermedades, también suele contener nutrientes que pueden estimular el crecimiento de plantas acuáticas y pueden incluir también compuestos tóxicos. Es por todo ello que la evacuación inmediata y sin molestias del agua residual de sus fuentes de generación, seguida de su tratamiento

y eliminación, es no sólo deseable, sino también necesaria en toda sociedad industrializada.

Dentro de los contaminantes más importantes en las aguas amargas generadas por las refinerías de petróleo se encuentra el Sulfuro. Estudios previos señalan que diferentes quinonas, con propiedades redox, son capaces de oxidar el sulfuro durante su utilización como agente reductor en la transformación de diferentes contaminantes (Field *et al.* 2000). Sin embargo, aún se desconoce la eficiencia que tienen diferentes quinonas, como las estudiadas en el presente trabajo, para estimular la oxidación de sulfuro. La información recabada en este estudio, permitirá establecer estrategias para un mejor tratamiento de los efluentes descargados por las refinerías de petróleo, las cuales contienen altos niveles de este contaminante.

#### **1.4 Objetivo**

- Objetivo general:

Medir la velocidad de reducción de diferentes quinonas por medio de distintas concentraciones de sulfuro para determinar el papel que jugarán las sustancias húmicas en la oxidación del sulfuro en aguas residuales.

- Objetivos particulares:
  - Evaluar las velocidades de reducción de las diferentes quinonas a diferentes concentraciones de sulfuro.
  - Evaluar cuál de las quinonas es la más adecuada para ser reducida por medio de sulfuro.

### **1.5 Limitaciones**

El uso de quinonas como donadores de electrones durante la reducción de intermediarios de desnitrificación en los procesos biológicos es un tema poco conocido y que tiene pocos años de haberse descubierto. Por lo tanto, existe escasa información bibliográfica, lo cuál es un factor limitante

Los resultados que se obtengan en este experimento están dirigidas a aquellas industrias generadoras de aguas residuales que contengan contaminantes difíciles de degradar.

---

---

## II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

### 2.1 Desnitrificación

Altas concentraciones de nitrógeno en aguas residuales provenientes de la refinería de petróleo demandan un proceso de nitrificación-desnitrificación para llevar a cabo una descontaminación de este tipo de efluentes.

Una vez que se ha oxidado el amonio a nitrato, este último puede ser reducido a  $N_2$  mediante la desnitrificación biológica. La desnitrificación es un proceso respiratorio anaerobio heterotrófico del tipo anóxico (similar al de los microorganismos de respiración aerobia) donde la reducción del nitrato hasta  $N_2$  sigue una serie de pasos que involucran la actividad de enzimas diferentes. Los géneros desnitrificantes más citados incluyen, *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Thiobacillus* y *Thiosphaera*, entre otros. La mayoría de ellos son heterótrofos, pero algunos pueden crecer autotróficamente en hidrógeno y  $CO_2$ ,



o en compuestos sulfurados reducidos, como el sulfuro. La mayoría de estos microorganismos poseen la enzima nitrato reductasa para reducir nitrato a nitrito (Böck *et al.*, 1995).

El primer paso de la desnitrificación es la reducción de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$ , catalizado por la nitrato reductasa. El segundo paso es la reducción de  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}$  por medio de la nitrito reductasa. La reducción de  $\text{NO}$  a  $\text{N}_2\text{O}$ , está catalizada por la óxido nítrico reductasa, localizada en la membrana citoplasmática. La última etapa de la desnitrificación es la reducción de  $\text{N}_2\text{O}$  a  $\text{N}_2$ . Es llevada a cabo por la óxido nitroso reductasa, localizada en el periplasma. Esta enzima es severamente inhibida por la presencia de oxígeno. Debido a esto, es importante evitar la entrada de oxígeno en el proceso desnitrificante para no liberar  $\text{N}_2\text{O}$ , gas que contribuye al efecto invernadero del planeta. Evidencias recientes han mostrado que la concentración de cobre en el influente de un reactor continuo desnitrificante juega un papel importante para evitar la acumulación de  $\text{N}_2\text{O}$  durante la eliminación de concentraciones altas de nitrato (Cervantes *et al.*, 1998).

La acumulación de intermediarios durante el proceso desnitrificante podría ser explicado por la siguiente secuencia de reacciones:



Cada paso tiene una velocidad específica que depende de las características cinéticas de cada enzima. Así, si las enzimas involucradas en los últimos pasos presentan una velocidad de reacción menor que las de la primera etapa, habrá la acumulación de intermediarios. Algunas evidencias encontradas en la literatura muestran concordancia con lo anterior. De hecho, se ha visto que la reducción del óxido nitroso es la etapa más lenta durante la reducción de nitrato a  $\text{N}_2$ , por lo tanto, hay acumulación de  $\text{N}_2\text{O}$ .

Una variable ambiental que también puede influir en la acumulación de intermediarios indeseables en un proceso desnitrificante es el pH. Se ha descrito que en condiciones ácidas (pH 6 o menor) se acumula ácido nitroso, muy tóxico para las bacterias. A valores de pH ligeramente alcalinos, el nitrato es convertido en  $N_2$  (Gommers *et al.*, 1988).

## 2.2 Propiedades catalíticas del Humus

El humus es la fracción orgánica más abundante en la biosfera. Esta compuesto de una estructura compleja en la que polímeros recalcitrantes prevalecen por décadas o incluso siglos. A pesar de ser recalcitrantes, las sustancias húmicas pueden jugar un papel importante en la conversión anaerobia de sustratos orgánicos mediante su participación en la respiración microbiana como aceptores de electrones. Las quinonas son los grupos funcionales que aceptan los electrones directamente durante la reducción microbiana del humus. Las quinonas presentes en el humus no solamente sirven como aceptores de electrones en la respiración microbiana, sino también, como mediadores de óxido reducción (redox) durante la transferencia de electrones en reacciones químicas y microbianas.

La primera indicación de que el humus podría jugar un papel importante en el transporte de electrones durante la respiración anaerobia de microorganismos fue reportado por Lovley *et al.* (1996a). En este estudio se probó la capacidad de diferentes bacterias, como *Geobacter metallireducens*, para oxidar diferentes sustratos empleando ácidos húmicos o el compuesto modelo 2,6-disulfonato de antraquinona (AQDS) como únicos aceptores de electrones. Se encontró que la conversión de acetato, y otros compuestos, a  $CO_2$  estaba acoplada a la reducción de las quinonas en el humus o de AQDS a sus correspondientes hidroquinonas (forma reducida de las quinonas). A partir de entonces, se ha reportado una gran variedad de microorganismos reductores del humus (MRH) que son capaces de oxidar diferentes sustratos simples acoplado a este proceso respiratorio. La mayoría de los

MRH son bacterias reductoras de Fe(III) de la familia *Geobacteraceae* (Lovley *et al.*, 1996a), pero la gran diversidad incluye también otros tipos de bacterias reductoras del Fe(III) como *Pantoea agglomerans* y *Thermoanaerobacter siderophilus*. Además, existen bacterias sulfato-reductoras, como *Desulfovibrio* G11, haloespiradoras, como *Desulfitobacterium dehalogenans*, fermentativas, como *Propionibacterium freudenreichii*, y metanogénicas, como *Methanospirillum hungatei*, que también pueden acoplar la reducción de sustancias húmicas a la oxidación anaerobia de diferentes sustratos (Cervantes *et al.*, 2002). La extensa variedad de microorganismos que son capaces de usar el humus como aceptor final de electrones coincide con la diversidad de ambientes en los que se ha reportado la capacidad de reducir el humus. En efecto, se reportó que inóculos originados de plantas de tratamiento de aguas residuales, sedimentos marinos, sedimentos contaminados o ricos en materia orgánica y suelos con diferentes características pudieron oxidar una gran variedad de sustratos acoplado a la reducción de sustancias húmicas (Cervantes *et al.*, 2000a). Entre los sustratos oxidados están acetato, lactato, etanol, glucosa, hidrógeno, propionato y piruvato, entre otros.

### **Reactividad de las hidroquinonas con metales y sus implicaciones.**

Las hidroquinonas formadas durante la reducción microbiana del humus son muy reactivas con diferentes óxidos metálicos que son muy abundantes en diferentes sedimentos y suelos, como la magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) o la vernadita ( $\text{MnO}_2$ ), permitiendo con ello su regeneración al estado oxidado (Lovley *et al.*, 1996a). La regeneración de las hidroquinonas en el humus a su estado oxidado permite que una vez más se encuentren disponibles para ser reducidas por los MRH (Figura 1).

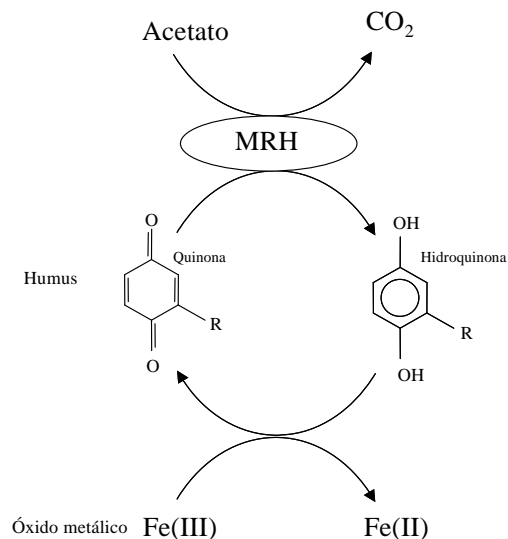


Figura 1. Oxidación de acetato por microorganismos reductores del humus (MRH) acoplado a la reducción de óxidos férricos en la que participan las quinonas como transportadores de electrones.

Este mecanismo de reciclaje en el humus implica que, para lograr la oxidación de compuestos orgánicos en sedimentos o suelos ricos en óxidos metálicos, no necesariamente se requerirá la participación de una gran cantidad de humus. De hecho, existen microorganismos que no son capaces de reducir óxidos férricos directamente, pero que, mediante la participación de quinonas como acarreadores de electrones, logran acoplar este proceso a la oxidación de diferentes sustratos (Cervantes *et al.*, 2002).

### **Oxidación anaerobia de compuestos recalcitrantes acoplado a la reducción del humus.**

Después de que la reducción del humus fue descubierta como un proceso respiratorio microbiano, surgieron múltiples reportes que indicaron que no solamente se podrían oxidar compuestos simples a través de este proceso fisiológico, sino también, diferentes compuestos recalcitrantes. El primer estudio que reportó la participación del humus como aceptor final de electrones en la oxidación anaerobia

de contaminantes difíciles de degradar, fue el descrito por Bradley *et al.* (1998). En este trabajo se encontró que un sedimento rico en materia orgánica fue capaz de convertir los solventes clorados [1,2-<sup>14</sup>C]cloruro de vinilo y [1,2-<sup>14</sup>C]dicloroetano a <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> cuando se agregaron ácidos húmicos como aceptores finales de electrones. Mientras tanto, la conversión ocurrida en la ausencia de sustancias húmicas fue despreciable. El papel de las quinonas como aceptores de electrones fue verificado al incubar el mismo sedimento con [1,2-<sup>14</sup>C]cloruro de vinilo como única fuente de energía y AQDS como aceptor de electrones. En estas incubaciones se observó el acoplamiento entre la conversión del solvente a <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> y la reducción de AQDS a AH<sub>2</sub>QDS (forma reducida de AQDS).

Posteriormente se reportó que también compuestos aromáticos pueden ser oxidados biológicamente mediante el empleo de quinonas como aceptores de electrones. En primera instancia, se observó que los inóculos obtenidos de diferentes plantas de tratamiento de aguas residuales industriales fueron capaces de degradar benzoato, fenol y *p*-cresol ligado a la reducción de AQDS. Todos estos compuestos fueron convertidos a metano, por los mismos inóculos, cuando se incubaron en la ausencia de AQDS. Sin embargo, la adición de AQDS como aceptor final de electrones, permitió que la biodegradación de estos contaminantes estuviera acoplado a la reducción de quinonas y no a la metanogénesis (Cervantes *et al.*, 2000b). Posteriormente se descubrió que los inóculos obtenidos de diferentes sedimentos acuáticos fueron capaces de mineralizar [<sup>13</sup>C]tolueno cuando se proporcionó humus o AQDS como aceptor final de electrones en las incubaciones. En los controles en los que no se adicionaron sustancias húmicas no hubo conversión de [<sup>13</sup>C]tolueno (marcado uniformemente), mientras que el 50 y el 85 % del [<sup>13</sup>C] tolueno adicionado en los cultivos con ácidos húmicos y AQDS, respectivamente, fue convertido a <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> (Cervantes *et al.*, 2001a). El proceso de mineralización de [<sup>13</sup>C]tolueno estuvo acoplado a la reducción estequiométrica del humus y AQDS.

---

---

Estos estudios han sido las primeras demostraciones de que el humus no solamente puede participar como aceptor final de electrones para la conversión de sustratos simples, sino también, para estimular la degradación de contaminantes prioritarios. Esto podría tener importantes repercusiones en la bioremediación de muchos sitios contaminados si se considera la gran abundancia del humus en lugares como pantanos, lagos, humedales, sedimentos ricos en materia orgánica, composta, etc. Además, el humus podría tener el mismo impacto catalítico en sitios en los que no es muy abundante, ya que su alta reactividad con óxidos de Fe(III) y Mn(IV), los cuales son muy abundantes en el suelo y sedimentos acuáticos, le permite ser reciclado y actuar en múltiples ocasiones como aceptor de electrones.

### **El humus en el transporte de electrones para la biodegradación reductiva de contaminantes.**

Las quinonas en el humus no solamente pueden actuar como aceptores de electrones en la oxidación microbiana de muchos compuestos orgánicos. (Figura 2) sino que los mecanismos catalíticos del humus y las quinonas involucran procesos abióticos y biológicos en los que las sustancias húmicas aceleran las transformaciones reductivas en uno a varios órdenes de magnitud (Field *et al.*, 2000).

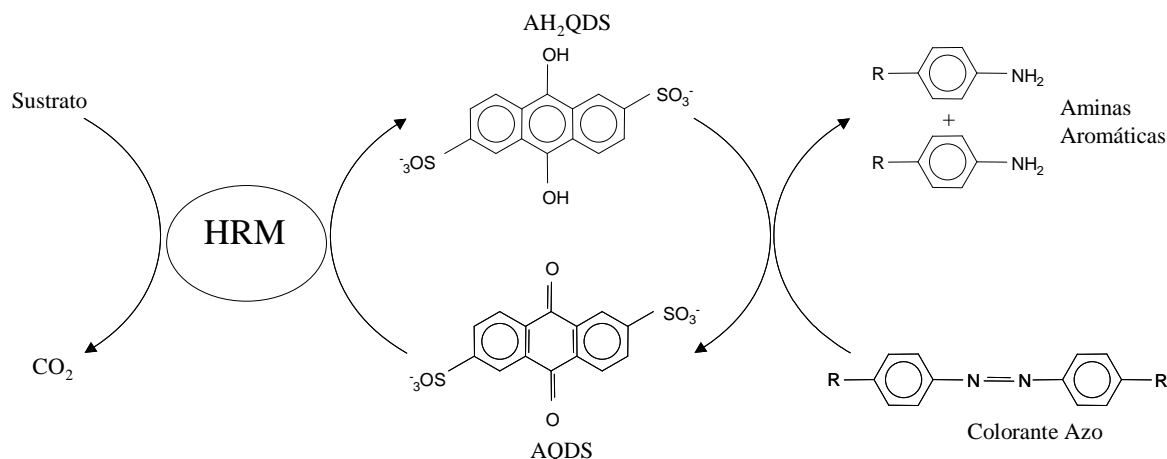


Figura 2. Mecanismo de reducción de colorantes azo a través del compuesto modelo AQDS (2,6-disulfonato de antraquinona). Los microorganismos reductores del humus (MRH) reducen las quinonas en el humus y las hidroquinonas formadas transfieren los electrones al grupo azo para reducirlo a aminas aromáticas.

Otro tipo de contaminantes que pueden ser convertidos aceleradamente por medio del humus o compuestos análogos (quinonas) son los colorantes tipo azo. Debido a que el enlace  $-N=N-$  es muy electrofílico se requiere de condiciones reductivas para poder convertir este tipo de colorantes a sus correspondientes aminas aromáticas. La reducción del enlace azo ocurre muy lentamente en muchos tipos de colorantes azo por lo que se requiere de la aplicación de sustancias húmicas, como acarreadores de electrones, para acelerar el proceso decolorante. La reducción de varios colorantes azo a sus aminas aromáticas fue acelerada por medio de la adición de diferentes quinonas a cultivos bacterianos de *Sphingomonas sp.* BN6, usando glucosa como fuente de electrones (Kudlich *et al.*, 1997). El mecanismo de acción se describe en la Figura 2. A partir de este descubrimiento, se ha probado la eficiencia de diferentes quinonas en la decoloración de diferentes colorantes azo en reactores de tratamiento de aguas residuales (Cervantes *et al.*, 2001c; Laszlo, 2000; Van der Zee *et al.*, 2001). Los estudios muestran que es posible lograr un proceso decolorante eficiente aún cuando se opera a tiempos de residencia hidráulicos de 2 horas. Estos resultados

tienen importantes implicaciones en el tratamiento de aguas residuales de la industria textil.

Los compuestos aromáticos que contienen uno o más grupos –nitro (nitroaromáticos) son otro grupo de contaminantes que requieren de condiciones reductoras para poder ser convertidos. Como en los casos anteriores, la aplicación de diferentes sustancias húmicas a sistemas de conversión ha permitido aumentar hasta 500 veces la velocidad de reducción del grupo –nitro al correspondiente grupo –amino (Dunnivant *et al.*, 1990; Schwarzenbach *et al.*, 1990).

La reducción de metales radiactivos, como U(VI) y Tc(VII), es otro proceso en el que se ha mostrado el papel catalítico del humus. El microorganismo resistente a radiaciones, *Deinococcus radiodurans* R1, pudo reducir ambos radionucleótidos a sus formas insolubles, usando lactato como donador de electrones, cuando se incubó con AQDS. Por el contrario, en la ausencia de quinonas no hubo reducción de los metales radiactivos (Fredrickson *et al.*, 2000).

En todos estos casos en los que se ha demostrado el papel catalítico del humus, no fue necesario adicionar las sustancias húmicas en abundancia ya que durante el transporte de electrones, las quinonas son recicladas infinitas veces (Figura 2).

### **2.3 Eliminación simultánea de Carbono, Nitrógeno y Azufre**

Zepeda *et al.* (2003) han aportado evidencias que muestran un aspecto novedoso de la nitrificación, su capacidad de biotransformar la materia orgánica a acetato, compuesto que puede ser oxidado a CO<sub>2</sub> por medio de la desnitrificación. Al respecto, es necesario abundar más sobre este punto.

Una alternativa para la eliminación biológica del azufre, es por medio de la desnitrificación (proceso anaerobio) litoautotrófica en condiciones alcalinas, en donde el sulfuro actúa como donador de electrones para reducir el nitrato a nitrógeno



molecular y el sulfuro se oxida a sulfato, aunque mediante el manejo estequiométrico de la relación S/N en el proceso biológico, el producto final puede ser azufre elemental y  $N_2$  (Gommers et al. 1988). Se cuentan con evidencias recientes que muestran que la eliminación del sulfuro y nitrato puede llevarse a cabo con una eficacia aceptable, aun en presencia de materia orgánica, con lo cual se eliminan eficaz y simultáneamente S, N y C (Reyes et al. 2000). No obstante, los mecanismos que permitan entender el fenómeno no están aún debidamente descritos.

En la desnitrificación heterotrófica pueden ser empleadas diferentes fuentes reductoras, destacando los ácidos grasos volátiles, con los que se pueden lograr eficiencias de eliminación de nitrato del 100% y rendimientos (eficiencia de conversión) de casi 1 a velocidades de carga de (o mayores que) 3 g  $N-NO_3^-/Ld$  y valores equivalentes de velocidades de producción de  $N_2$ . Otra fuente reductora, recientemente identificada y con un potencial significativo, es el metano (Islas et al. 2003). Cabe decir que las características cinéticas de la desnitrificación litotrófica parecen ser más lentas, pero es aplicable a efluentes cuando el carbono orgánico en las aguas residuales está en una concentración muy baja. En este mismo contexto, existen evidencias de una desnitrificación litotrófica alternativa, que ocurre en la sola presencia de nitrito y amonio, formándose  $N_2$ . También hay evidencias de que el amonio y el nitrato forman  $N_2$ , pero debe estar presente carbono orgánico (Cervantes et al., 2002a). De los procesos desnitrificantes hasta ahora identificados, posiblemente el más rápido es el heterotrófico.

Existen evidencias que indican que las quinonas, compuestos muy abundantes en el humus y la materia orgánica de suelos y sedimentos, pueden jugar un papel importante en la transformación de diferentes contaminantes bajo condiciones anaerobias, ya que pueden actuar como aceptores de electrones o como mediadores de óxido-reducción. Existe una gran variedad de compuestos orgánicos, incluyendo contaminantes aromáticos como el tolueno y el fenol, que pueden ser oxidados por consorcios bacterianos utilizando quinonas como aceptores finales de electrones (Cervantes et al. 2001b). El sulfuro también puede ser oxidado por su reacción

---

---

química con quinonas. Las quinonas son compuestos muy estables, que poseen propiedades catalíticas que les permite ser oxidadas y reducidas en un infinito número de ciclos, aumentando la velocidad de oxidación o reducción de diferentes contaminantes (Field *et al.* 2000).

Tomando en cuenta todas estas consideraciones, es esperable que las quinonas al ser aplicadas a niveles catalíticos en reactores desnitrificantes, puedan incrementar la velocidad de transferencia de electrones en los procesos biológicos, contribuyendo de esta manera a la eliminación simultánea de C, N y S. En consecuencia, es posible pensar que la velocidad de eliminación de la materia orgánica recalcitrante, en presencia de transportadores de electrones, se incremente.

---

---

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Curvas de calibración.

Se realizó una curva patrón para cada una de las quinonas utilizando concentraciones de quinona de 0 a 150 mg/L y de 0 a 2 ml. De solución amortiguadora se midieron las absorbancias y se realizaron las curvas patrón para cada quinona.

Para AQDS se realizó una curva de calibración (figura 1) con el fin de obtener la ecuación de la recta y de esta forma aplicarla posteriormente para obtener las concentraciones de quinona reducida con sulfuro.

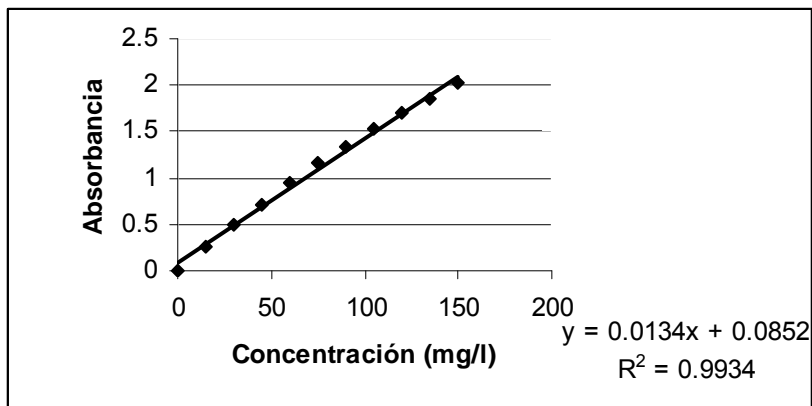


Figura 1. Curva de calibración de AQDS ( $\lambda=340$ ).

En la figura 2 podemos observar la curva patrón para lawsona, misma que se realizó a partir de una solución de dicha quinona a una concentración de 150 mg/L y con un buffer de bicarbonato de sodio (5 g/L). Esta gráfica se empleó como base para determinar las concentraciones de lawsona reducidas por medio de sulfuro.

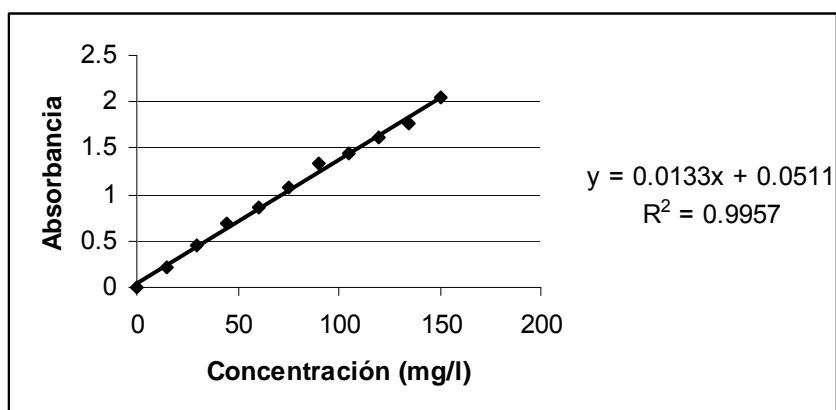
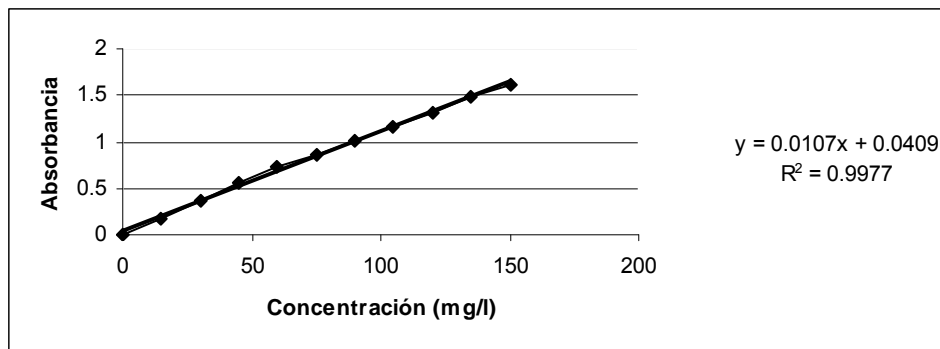


Figura 2. Curva de calibración de lawsona ( $\lambda=340$ ).

Para naftoquinona se realizó la siguiente curva de calibración (figura 3) a partir de una concentración inicial de 150 mg/L y empleando también, como en los casos anteriores, una solución amortiguadora de bicarbonato de sodio (5 g/L).

Figura 3. Curva de calibración de naftoquinona ( $\lambda=346$ ).

#### 4.2 Reducción de AQDS

El comportamiento de la reducción de AQDS por medio de sulfuro se presenta en la figura 4. Se puede observar de una manera global que al ir aumentando la concentración de sulfuro hasta 250 mg/L la velocidad de reducción aumenta y es en dicha concentración que se observa la velocidad máxima ya que de 500 mg/L en adelante la velocidad disminuye de manera muy notoria. La velocidad de reducción más alta observada fue de 0.0676 mmol/hr a una concentración de 2500 mg/L de Sulfuro.

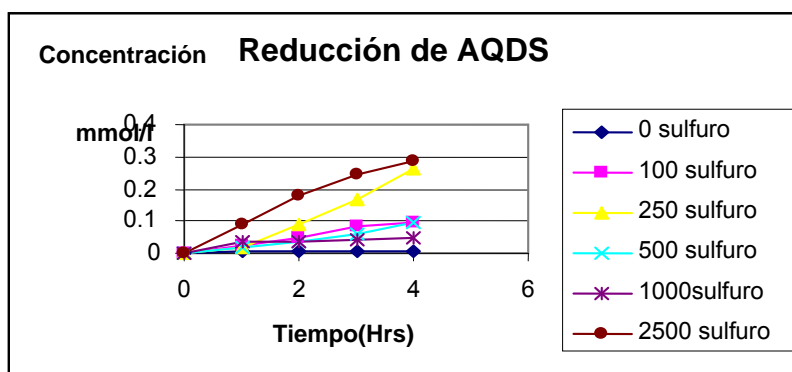


Figura 4. Reducción de AQDS.

### 4.3 Reducción de lawsona

La figura 5 muestra que la velocidad de reducción de la lawsona fue muy parecida para las diferentes concentraciones de sulfuro adicionadas. La mayor velocidad de reducción de la lawsona fue de 1.7312 mmol/hr a una concentración de 1000 mg/l de sulfuro.

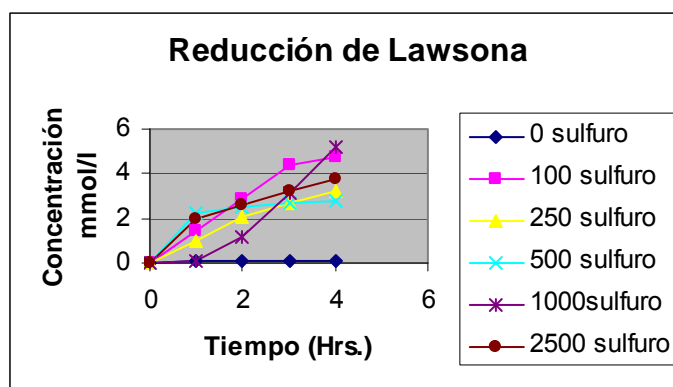


Figura 5. Reducción de lawsona.

### 4.4 Reducción de naftoquinona

La mayor velocidad de reducción de naftoquinona se pudo observar cuando la concentración de sulfuro fue de 1000 y 2500 mg/L, lográndose una reducción máxima de 0.1836 mmol/hr.

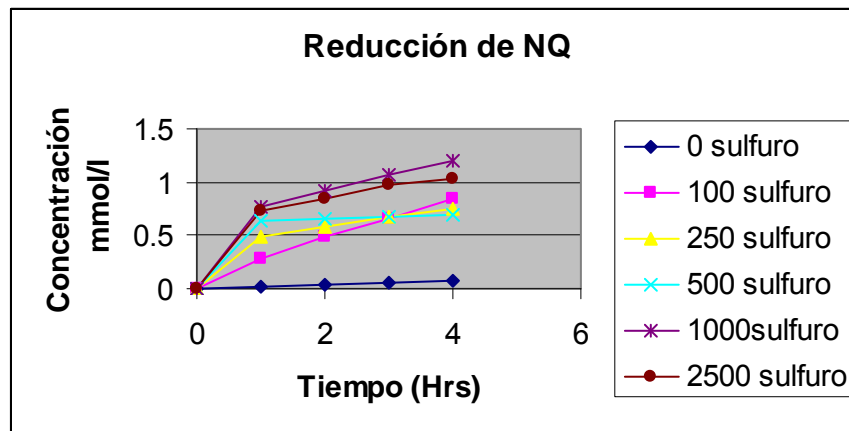


Figura 6. Reducción de naftquinona.

De manera general se puede destacar que la quinona que se redujo con mayor velocidad fue la lawsona cuya velocidad fue de 1.7312 mmol/hr, a una concentración de 1000 mg/l de Sulfuro, mientras que la naftoquinona mostró una menor velocidad de reducción que fue de 0.1836 mmol/hr. En cuanto a AQDS se observó una velocidad de 0.0676 mmol/hr a una concentración de 250 mg/l de Sulfuro

Existen evidencias que indican que las quinonas, compuestos muy abundantes en el humus y la materia orgánica de suelos y sedimentos, pueden jugar un papel importante en la transformación de diferentes contaminantes bajo condiciones anaerobias, ya que pueden actuar como aceptores de electrones o como mediadores de óxido-reducción. Existe una gran variedad de compuestos orgánicos, incluyendo contaminantes aromáticos como el tolueno y el fenol, que pueden ser oxidados por consorcios bacterianos utilizando quinonas como aceptores finales de electrones (Cervantes *et al.* 2001b). El sulfuro también puede ser oxidado por su reacción química con quinonas. Las quinonas son compuestos muy estables, que poseen propiedades catalíticas que les permite ser oxidadas y reducidas en un infinito número de ciclos, aumentando la velocidad de oxidación o reducción de diferentes contaminantes (Field *et al.* 2000).

---

---

Tomando en cuenta todas estas consideraciones, es esperable que las quinonas al ser aplicadas a niveles catalíticos en reactores desnitrificantes, puedan incrementar la velocidad de transferencia de electrones en los procesos biológicos, contribuyendo de esta manera a la eliminación simultánea de C, N y S. En consecuencia, es posible pensar que la velocidad de eliminación de la materia orgánica recalcitrante, en presencia de transportadores de electrones, se incremente.



---

---

### **III. METODOLOGÍA**

#### **3.1 Tipo de investigación**

Investigación exploratoria ya que mediante esta investigación se obtuvo información de la actividad intencional realizada y se encuentra dirigida a crear el fenómeno mismo que se indaga, y así poder observarlo.

#### **3.2 Ubicación del experimento**

Los experimentos y análisis se realizaron en el laboratorio de Análisis Especiales y de Ecodesarrollo de la Dirección de Recursos Naturales del ITSON.

#### **3.3 Materiales y reactivos**

---

---

### 3.3.1 Materiales

Espectrofotómetro marca Génesis 20 Thermospectronics, flujo de  $N_2/CO_2$  (tanque), cámara anaerobia marca Coy modelo 14500 (para formar atmósfera  $N_2/H_2$ , 54 botellas de vidrio, 54 tapones de goma, selladora, 3 vasos de precipitados, 1 matraz volumétrico de 1L., 2 matraces volumétricos de 50 ml., 2 micropipetas (100  $\mu$ l y 500  $\mu$ l ) 1 probeta de 50 ml., 1 espátula, 2 matraces erlenmeyer de 1000 ml. , jeringas estériles de 1 y 3 ml., , catalizador de paladio para la cámara anaerobia.

### 3.3.2 Reactivos

2,6-disulfonato de antraquinona (AQDS), 1,4-Naftoquinona (Lawsona), sodio-1,2-Naftoquinona-4-sulfato, bicarbonato de sodio y sulfuro de sodio nanohidratado.

## 3.4 Etapa experimental

### 3.4.1 Preparación de Soluciones:

#### Medio basal.

Se preparó un Medio basal con sistema de amortiguamiento con bicarbonato de Sodio (5 g/L) se sometió a un flujo de una fase gaseosa de  $N_2/CO_2$  (80:20).

#### Quinonas.

Se prepararon soluciones de las tres quinonas a una concentración de 150 mg/L. Esto se realizó a partir de 0.0075 g. de quinona y 50ml. De medio basal.

### Solución de Sulfuro Concentrado:

Se preparó una solución de sulfuro concentrado a partir de  $\text{Na}_2\text{S}$  nonahidratado obteniéndose 12.5 g.del ión sulfuro en un litro de solución.

### Reducción de Quinonas.

Se preparó medio basal y se distribuyó el volumen correspondiente a cada botella para que al final el volumen fuera igual a 50 ml/botella, se sellaron y se hicieron pasar por un flujo de  $\text{N}_2/\text{CO}_2$  durante 3-5 minutos para generar una atmósfera anóxica. Posteriormente, se agregaron las diferentes cantidades de sulfuro, se incubaron a  $30^\circ\text{C}$  durante la noche (12 horas). Al siguiente día se agregó la quinona correspondiente y se midió la absorbancia en la cámara anaerobia (se usó una atmósfera formada por  $\text{N}_2/\text{H}_2$  (95:5), así como la presencia de un catalizador de paladio para asegurar ausencia de oxígeno), de tal modo que se obtuvieron las concentraciones de quinona en mmol /L,

En las siguientes tablas se especifican las cantidades empleadas en los experimentos con las 3 quinonas.

mg. sulfuro + AQDS	Vol.Quinona(ml.)	Vol. Sulfuro (ml.)	Vol.Medio Basal(ml.)	Vol. total (ml.)
0	0.5	0	49.5	50
100	0.5	0.4	49.1	50
250	0.5	1	48.5	50
500	0.5	2	47.5	50
1000	0.5	4	45.5	50
2500	0.5	10	39.5	50

Tabla 1. Valores requeridos para realizar una curva de calibración para AQDS.

mg. sulfuro + AQDS	Vol.Quinona(ml.)	Vol. Sulfuro (ml.)	Vol.Medio Basa l(ml.)	Vol. total (ml.)
0	16.667	0	33.333	50
100	16.667	0.4	32.933	50
250	16.667	1	32.333	50
500	16.667	2	31.333	50
1000	16.667	4	29.333	50
2500	16.667	10	23.333	50

Tabla 2 Valores requeridos para realizar curvas de calibración para naftoquinona y lawsona.

Se realizaron 3 experimentos por separado, uno para cada quinona. Para cada experimento se tuvieron 18 botellas distribuidas de la siguiente forma: 3 botellas conteniendo únicamente el medio basal y la quinona sin sulfuro para ser utilizada como control), y las demás con concentraciones distintas de sulfuro (100, 250, 500, 1000 y 2500 mg/L) medio basal y quinona. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. Una vez adicionadas las quinonas se realizaron los muestreos cada hora por un periodo de cuatro horas, con el fin de determinar la velocidad de reducción de cada una de las quinona.

### 3.5 Técnicas analíticas.

El análisis de la reducción de las quinonas fue realizado en condiciones anaerobias, con muestras recolectadas en la cámara anaerobia  $N_2/H_2$  (95:5). Las muestras se depositaron en celdas de plástico. Las concentraciones de quinonas fueron determinadas por monitoreo de la absorbancia a 450 nm para lawsona y AQDS y a 340 nm para naftoquinona usando curvas de calibración.



---

---

## V. CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

Se comprobó que todas las quinonas utilizadas pudieron ser reducidas con sulfuro por lo tanto pueden contribuir a su transformación a azufre elemental en aguas residuales provenientes de la refinería de petróleo.

De las quinonas empleadas (AQDS, lawsona y NQ) en esta investigación, el modelo lawsona presenta una mayor velocidad de reducción con sulfuro, por lo que se recomienda su uso en el tratamiento de aguas residuales generadas por la refinería de petróleo.

Se recomienda dar seguimiento a esta investigación, ya que estos experimentos realizados demuestran las velocidades de reducción de tres quinonas con sulfuro.

Sin embargo es muy importante continuar con el diseño de un biorreactor que implemente esta técnica, para poder ser utilizado a nivel industrial, cumplir con las normas oficiales mexicanas referentes a efluentes de las refinerías de petróleo y contribuir al desarrollo sustentable.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Böck E., Koops H. P., Harms H., and Ahlers B. (1991). The biochemistry of nitrifying microorganisms. In: Variations in: Autotrophic Life, edited by Böck E. pp 171-200. Ed. Academic Press, London.

Bradley, P. M., F. H. Chapelle and D. R. Lovley. (1998) Humic acids as electron acceptors for anaerobic microbial oxidation of vinyl chloride and dichloroethene. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3102-3105.

Cervantes Francisco (2002) .Quinonas como aceptores de electrones y mediadores redox en la biotransformación de contaminantes prioritarios. Tesis doctoral. Wageningen

Cervantes F. J., De la Rosa D. and Gomez J. (2001a). Enhanced denitrification at low C/N ratios with ammonium as alternative electron donor. *Bioresource Technology*, 79, 165-170.

Cervantes F. J., Dijkstra W., Duong-Dac T., Ivanova A., Lettinga G. and Field J. (2001b). Anaerobic mineralization of toluene by enriched sediments with quinones and humus as terminal electron acceptors. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4471-4478.

Cervantes F. J., Monroy O. and Gomez J. (1998). Accumulation of intermediates in a denitrifying process at different copper and high nitrate concentration. *Biotechnol. Lett.* 20, 959-961.

Cervantes F. J., Monroy O. and Gomez J. (1999). Influence of ammonium on the performance of a denitrifying culture under heterotrophic conditions. *Appl. Biochem. Biotech.* 81, 13-21.

Cervantes F. J., Van der velde S., Lettinga G. and Field J. A. (2000a). Quinones as terminal electron acceptors for anaerobic microbial oxidation of phenolic compounds. *Biodegradation*, 11, 313-321.



Cervantes F.J., J. Perez y J. Gómez. (2000b). Avances en la Eliminación Biológica del Nitrógeno de las Aguas Residuales. *Revista Latinoamericana de Biotecnología*. 42, 73-82.

Cervantes, F. J., van der Velde, S., Lettinga, G. and Field, J. A. (2000d) Competition between methanogenesis and quinone respiration for ecologically important substrates in anaerobic consortia. *FEMS Microbiol. Ecol.* 34,161-171.

Cervantes, F. J., Vu-Thi-Thuy, L., Lettinga, G. and Field, J. A. (2001c) The role of quinones on the reductive dechlorination of carbon tetrachloride by anaerobic granular sludge. Proceedings of the 9<sup>th</sup> World Congress on Anaerobic Digestion (A. F. M. Van Velsen and W. H. Verstraete, Eds.) Vol. 2, 231-233. Antwerpen, Belgium.

Cervantes, F.J., De Bok F. A. M., Duong-Dac T., Stams, A. J. M., Lettinga G. and Field J. A. (2002b) Reduction of humic substances by halo-respiring, sulphate-reducing and methanogenic microorganisms. *Environ. Microbiol.* 4, 51-57.

Cervantes, F.J., van der Zee, F.P., Lettinga, G. and Field, J.A. (2001c). Enhanced decolourisation of acid orange 7 in a continuous UASB reactor with quinones as redox mediators. *Water Sci. Technol.* 44, 123-128.

C. Kennes and M.C. Veiga.: «Bioreactors for waste gas treatment», 2001, Ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Cuervo-López F. M., Martínez F., Gutiérrez-Rojas M., Noyola R. A. and Gómez J. (1999). Effect of volumetric loading rate and carbon source on denitrification and sludge settleability in UASB reactors. *Wat. Sci. Technol.* 40, 123-130.

Dunnivant, F., Schwarzenbach R. and Macalady D. (1992) Reduction of substituted nitrobenzenes in aqueous solutions containing natural organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 26, 2133-2142.

Elmén J., Pan W., Leung S. Y., Magyarosy A. and Keasling J. D. (1997). Kinetics of toluene degradation by a nitrate-reducing bacterium isolated from a groundwater aquifer. *Biotechnol. Bioeng.* 55(1), 82-90.

Enkerlin, Cano, Garza, Vogel (1997). *Ciencia ambiental y desarrollo sostenible*. Editorial Internacional Thomsom. México.

Field J. A., Cervantes F. J., Van Der Zee F. P. and Lettinga G. (2000). Role of quinonas in the biodegradation treatment in Mexico: State of the technology. *Wat. Res.* 34, 1803-1816.

of priority pollutants. A review. *Wat. Sci. Technol.* 42, 215-222.

Fredrickson, J. K., Kostandarithes, H. M., Li, S. W., Plymale, A. E. and Daly, M. J. (2000) Reduction of Fe(III), Cr(VI), U(VI), and Tc(VII) by *Deinococcus radiodurans* R1. *Appl. Environ. Microbiol.* 66,2006-2011.

Gomez J., Mendez-Pampin R. and Lema J. M. (2000). Kinetic study of the addition of volatile organic compounds on a nitrifying sludge. *Appl. Biochem. Biotech.* 87, 189-202.

Gommers P. J., Buleveld W., Zuiderwijk F.J., Kuenen J. and Gijs (1988). Simultaneous sulfide and acetate oxidation in a denitrifying fluidized bed reactor-I. *Wat. Res.* 22 (9), 1085-92.

González F., Medina L. (1999) *Contaminación Ambiental*. Diagráficos Unión S.A de C.V. 314-15

Islas L. S., Thalasso F. and Gomez J. (2003). Evidence of anoxic methane oxidation coupled to denitrification. Aceptado (*Water Reseach*).

Jiménez Blanca (2002). *La contaminación ambiental* .Editorial Limusa. México D.F.

Kudlich, M., Keck, A., Klein, J. and Stolz, A. (1997) Localization of the enzyme system involved in anaerobic reduction of azo dyes by *Sphingomonas* sp. Strain BN6 and effect of artificial redox mediators on the rate of azo dye reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3691-3694.

Laszlo, J. A. (2000) Regeneration of azo-dye-saturated cellulosic anion exchange resin by *Burkholderia cepacia*. *Environ. Sci. Technol.* 34, 167-172.

Lovley, D. R., Coates, J. D., Blunt-Harris, E. L., Phillips, E. J. P. and Woodward, J. C. (1996a) Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature* 382,445-448.

Lovley, D. R., Woodward J. C. and Chapelle F. H. (1996b) Rapid anaerobic benzene oxidation with a variety of chelated Fe(III) forms. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 288-291.

Metcalf y Eddy (1996). Ingeniería aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización. Volumen 2. Editorial McGRALL-HILL . México.

Novaro Octavio (1998). Contaminación . Editorial el Colegio Nacional. México

Reyes J. A., Razo E. F. and Gomez J. (2000). Simultaneous biological removal of nitrogen, carbon and sulfur by denitrification. Seventh Annual International Petroleum Environmental Conference. Nov. 7-10, 2000. Albuquerque, New Mexico, USA.

Schwarzenbach, R., Stierli, R., Lanz, K and Zeyer, J. (1990) Quinone and iron porphyrin mediated reduction of nitroaromatic compounds in homogeneous aqueous solution. *Environ. Sci. Technol.* 24: 1566-1574.

Scriban René (1985) . Biotecnología. Editorial Manual moderno . México D.F.

Stevenson F.J. (1994) Humus Chemistry. Génesis , Composition , Reactions. Segunda edición .Editorial Wiley. Nueva York

Sublette, K. (1987). Aerobic oxidation of hydrogen sulfide by *Thiobacillus denitrificans*. *Biotech. Bioeng.* 29, 690-895.

Texier A. -C. and Gomez J. (2002). Tolerance of nitrifying sludge to *p*-cresol. *Biotechnol. Lett.* 24, 321-324.

Van der Zee, F. P., Bouwman, R. H. M., Strik, D. P. B. T. B., Lettinga, G., and Field, J. A. (2001) Application of redox mediators to accelerate the transformation of reactive azo dyes in anaerobic bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 75, 691-701.

Zepeda P. A. Texier A. -C. and Gomez J. (2003). Benzene transformation in nitrifying batch cultures. *Biotechnol. Progress* 19, 789-793.