



---

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA**

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIAS ALIMENTARIAS

---

---

**BIODEGRADACIÓN DE COMPUESTOS  
FENÓLICOS CON DIFERENTES ACEPTORES DE  
ELECTRONES POR CONSORCIOS ANAEROBIOS**

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**INGENIERO BIOTECNÓLOGO**

PRESENTA:

**KITZIA YANIRA LÓPEZ ARMENTA**

CD. OBREGÓN, SONORA. AGOSTO DE 2006

## DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

**A Dios**, por darme la oportunidad de estar en esta vida.

**A mi familia**, por su apoyo y amor incondicional siempre.

**A mis amigos**, por su compañía y los grandes momentos que me han regalado.

**A mi asesor**, por su enseñanza, su dedicación y paciencia.

Y a todos aquellos que de alguna manera fueron partícipes para obtener este logro.

**¡ GRACIAS !**

*Kitzia Yanira López Armenta*

## ÍNDICE

	Pág.
<b>Lista de tablas</b> .....	iv
<b>Lista de figuras</b> .....	v
<b>Resumen</b> .....	vii
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Justificación.....	2
1.2. Planteamiento del problema.....	3
1.3. Hipótesis.....	4
1.4. Objetivos.....	5
1.4.1. Objetivos específicos.....	5
<b>CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	6
2.1. Generalidades del humus.....	6
2.2. Funciones del humus.....	6
2.2.1. Como aceptor final de electrones en la respiración microbiana.....	7
2.2.1.1. Contaminantes.....	8
2.2.2. Como mediadores redox (transportadores de electrones).....	12
2.2.3. Como donadores de electrones.....	16
2.3. Aplicación del humus en sitios contaminados.....	18
2.3.1. Ventajas de utilizar el humus en bioremedación.....	18
2.4. Microorganismos reductores del humus.....	19

2.5. Metanogénesis .....	21
2.6. Desnitrificación .....	22
2.7. Sulfato – reducción.....	24
<b>CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
3.1. Ubicación de los experimentos .....	26
3.2. Inóculos.....	26
3.3. Medio basal .....	27
3.4. Diseño experimental.....	28
3.5. Métodos analíticos.....	29
<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>30</b>
4.1. Resultados.....	30
4.2. Discusión de resultados.....	38
<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>40</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>41</b>

**LISTA DE TABLAS**

Tabla 1. Diversidad filogenética de microorganismos reductores de humus y/o AQDS.....	20
Tabla 2. Tratamientos.....	28
Tabla 3. Grado de degradación y recuperación de sustratos.....	37

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reciclaje de quinonas en humus por óxidos minerales para la biodegradación de benceno.....	10
Figura 2. Ruta propuesta en la degradación anaerobia de fenol.....	11
Figura 3. Mecanismo de reducción de colorantes azo a través del compuesto modelo AQDS (2,6-disulfonato de antraquinona) .....	13
Figura 4. Oxidación de acetato por microorganismos reductores del humus (MRH) acoplado a la bioreducción del nitrato en la que participan las hidroquinonas como donadores de electrones.....	16
Figura 5. Reacciones microbianas y abióticas en un ciclo de las quinonas en el humus.....	17
Figura 6. Proceso global de la descomposición anóxica, mostrando la forma en que varios grupos fermentativos actúan en la conversión de materiales orgánicos complejos a CH <sub>4</sub> y CO <sub>2</sub> .....	21
Figura 7. Productos obtenidos en la degradación de fenol en ausencia y en presencia de AQDS, SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> y NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .....	32

Figura 8. Productos obtenidos de la degradación de *p*-cresol por un lodo granular anaerobio en ausencia y en presencia de AQDS,  $\text{SO}_4^{-2}$  y  $\text{NO}_3^-$  .....34

Figura 9. Productos obtenidos de la degradación de fenol por el sedimento de un manglar en ausencia y en presencia de AQDS,  $\text{SO}_4^{-2}$  y  $\text{NO}_3^-$  .....35

Figura 10. Productos obtenidos de la degradación de *p*-cresol por un sedimento de un manglar en ausencia y en presencia de AQDS,  $\text{SO}_4^{-2}$  y  $\text{NO}_3^-$  ...36

## RESUMEN

El humus es la materia orgánica acumulada en suelos y sedimentos acuáticos que ocupa la mayor parte de la biósfera y se ha encontrado que puede jugar un papel importante en la transformación de compuestos orgánicos e inorgánicos para la restauración de ambientes anaerobios contaminados. La presente investigación se realizó durante el periodo de Enero a Julio 2006, en los laboratorios de Ecodesarrollo y Análisis Especiales del ITSON, con el objetivo de comparar la capacidad de un lodo granular anaerobio y un sedimento de un manglar para degradar fenol y *p*-cresol en presencia de diferentes aceptores de electrones. La medición cualitativa y cuantitativa de sustratos consumidos y productos generados se llevó a cabo mediante técnicas cromatográficas y colorimétricas. Fenol y *p*-cresol fueron convertidos a metano, excepto en los cultivos con sedimento de un manglar, cuando bicarbonato fue el único aceptor de electrones disponible. Cuando AQDS, nitrato y sulfato fueron incluidos al medio como alternativa de aceptor de electrones, la oxidación de los compuestos fenólicos fue acoplada a la reducción de AQDS, nitrato y sulfato respectivamente. Estos resultados demuestran en primer instancia que la degradación anaerobia de compuestos fenólicos puede ser acoplada a la reducción de quinona, nitrato y sulfato como aceptores finales de electrones y que además la desnitrificación es el proceso respiratorio preferido en todos los casos sobre la respiración de quinonas, la sulfato-reducción y en último lugar la metanogénesis.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes.

El humus es la materia orgánica que se acumula en el suelo y en los sedimentos acuáticos, y que constituye la fracción orgánica más abundante de la biósfera. Su recalcitrancia tan persistente le permite tener una vida media de hasta 500 años (Stevenson, 1994). Estudios recientes han indicado que el humus puede jugar un papel importante en la transformación de compuestos orgánicos e inorgánicos en ambientes anaerobios. Estos estudios revelan que las quinonas, estructuras muy abundantes en el humus, son las responsables de las propiedades catalíticas del humus que pueden facilitar múltiples reacciones (Field *et al.*, 2000, Scott *et al.*, 1998). La acción catalítica del humus puede darse tanto en sustratos simples, como en contaminantes prioritarios (Cervantes, *et al.*, 2000, 2001).

Las tres principales funciones catalíticas que pueden jugar las quinonas en el humus son: 1) como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria de diferentes microorganismos; 2) como mediadores óxido reducción (redox) acelerando la transferencia de electrones entre una fuente reductora y un aceptor final de electrones; y 3) como donador de electrones para la reducción microbiana de aceptores de electrones más oxidados como el nitrato (Field *et al.*, 2000).

La aplicación del humus a sitios contaminados para estimular su bioremediación, resulta ser una idea atractiva, puesto que presenta ventajas respecto a otras técnicas: En primer lugar es muy abundante y su obtención no representa una inversión mayor; en segundo término las propiedades inertes del humus garantizan que al aplicarlo no conlleva la acumulación de intermediarios o productos indeseables como ocurre con otros compuestos como el sulfato y el nitrato (Anderson & Lovley, 2000; Hutchins *et al.*, 1991). Otra ventaja es la mayor solubilidad de las sustancias húmicas en el agua respecto a otros aceptores de electrones alternos ( $O_2$ , Fe(III) y Mn(IV)). Además se deben considerar también las propiedades para absorber metales pesados y compuestos orgánicos (Stevenson, 1994). Por lo tanto, la aplicación del humus para estimular la biorremediación de sitios contaminados debe ser considerada como una buena alternativa para la restauración de sitios contaminados con diferentes contaminantes prioritarios.

Se conocen algunas de las bondades que representa el utilizar el humus para restaurar ambientes anaerobios contaminados. Sin embargo, resulta necesario conocer los efectos catalíticos del humus en presencia de otros aceptores de electrones alternos; ver la competencia que se genera por el sustrato disponible en el medio, y qué tan factible es la biodegradación de los contaminantes presentes.

## **1.2. Justificación.**

La presencia del humus en procesos de conversión, tanto químicos como biológicos, es un tema recientemente descubierto. No se cumple una década que se reportó por primera vez al humus como un potencial aceptor final de electrones en la respiración microbiana, sin embargo se sabe que puede jugar un papel importante en la degradación anaerobia de compuestos sencillos y complejos. Puede participar de

diferentes maneras: aceptor de electrones, donador de electrones y mediador en reacciones óxido reducción. En un sistema anaerobio natural, puede existir una diversidad de microorganismos, los cuales compiten por el sustrato disponible contra las bacterias reductoras del humus, pudiendo afectar la acción catalítica del humus.

En la actualidad, se desconoce el efecto que pudiera impartir la presencia de bacterias sulfato-reductoras y desnitrificantes en un sistema que se pretenda restaurar con ayuda del humus. De aquí se deriva el interés por investigar la capacidad catalítica del humus en presencia de aceptores de electrones alternos como sulfato y nitrato, durante la oxidación anaerobia de sustratos ecológicamente importantes (compuestos fenólicos).

El conocimiento del efecto que imparte la presencia de aceptores de electrones alternos en un sistema anaerobio conteniendo bacterias que compiten por los sustratos disponibles, ayudará a entender el papel que juega el humus en este tipo de ambientes: 1) si es estimulado o inhibido su poder catalítico; 2) si favorece la desnitrificación a nitrógeno elemental, o propicia solo su reducción a nitrito; 3) si favorece la sulfato-reducción hasta sulfuro, o solo propicia su reducción a sulfito. Los resultados obtenidos en estos experimentos permitirán predecir el comportamiento fisiológico de las bacterias reductoras del humus en presencia de contaminantes prioritarios como el fenol.

### **1.3. Planteamiento del problema.**

El humus presenta propiedades potenciales en la biodegradación anaerobia de compuestos simples y recalcitrantes. En un ambiente anaerobio natural, pueden

coexistir bacterias metanogénicas, bacterias reductoras de sulfato o nitrato que tengan la capacidad de competir por los sustratos disponibles con las bacterias reductoras del humus. En este caso, no es posible discernir si las propiedades catalíticas del humus se ven afectadas por estos consorcios microbianos.

La competencia por sustratos puede darse entre bacterias metanogénicas, bacterias reductoras del humus, nitrato y sulfato, ya que es factible encontrar estos aceptores de electrones en múltiples ambientes anaerobios. Los sustratos a los que comúnmente pueden acceder los microorganismos, son los intermediarios clave en la ruta trófica (Ej. acetato, lactato).

El presente trabajo aportará datos inéditos que ayudarán a predecir el papel catalítico del humus en la degradación anaerobia de compuestos fenólicos, así como la competencia por el sustrato entre los diferentes aceptores de electrones (sulfato y nitrato).

#### **1.4. Objetivos.**

Determinar la competencia entre metanogénesis, respiración de quinonas, desnitrificación y sulfato-reducción; mediante la cuantificación de compuestos consumidos y generados durante la oxidación anaerobia de compuestos fenólicos.

##### **1.4.1. Objetivos específicos**

- Explorar la capacidad de cultivos microbianos obtenidos de diferentes ambientes de nuestro país (suelos y sedimentos) para degradar compuestos fenólicos

utilizando sustancias húmicas como aceptores de electrones en presencia de sulfato y nitrato.

- Determinar el proceso respiratorio predominante durante la degradación de compuestos fenólicos en presencia de AQDS, sulfato y nitrato por consorcios anaerobios.

### **1.5. Hipótesis.**

Las bacterias desnitrificantes presentan mejor acción competitiva por los compuestos fenólicos que las bacterias reductoras del humus, y éstas a su vez, que las bacterias sulfato-reductoras. Así mismo la adición del compuesto modelo del humus, antraquinona-2,6-disulfonato (AQDS) a los cultivos, inhibe la metanogénesis.

## CAPÍTULO II

### REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1. Generalidades del Humus.

El humus es la materia orgánica que se acumula en el suelo y en los sedimentos acuáticos y que constituye la fracción orgánica más abundante de la biosfera (Stevenson, 1994). El humus está compuesto de una estructura compleja en la que los polímeros recalcitrantes prevalecen por décadas. Sin embargo, a pesar de ser recalcitrantes, estos juegan 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 sirven también como mediadores de óxido reducción (redox) durante la transferencia de electrones en reacciones químicas y microbianas (Cervantes, 2002).

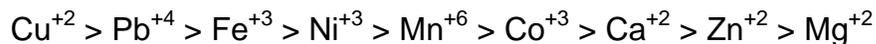
#### 2.2. Funciones del humus.

Estudios recientes han indicado que el humus puede jugar un papel importante en la transformación de compuestos orgánicos e inorgánicos en ambientes anaerobios,

como el suelo y los sedimentos de acuíferos. Estos estudios revelaron que las quinonas, estructuras muy abundantes en el humus, son las responsables de las propiedades catalíticas del humus que pueden facilitar múltiples reacciones (Field *et al.*, 2000, Scott *et al.*, 1998).

Así mismo, el humus proporciona un almacén para los cationes como potasio, calcio y magnesio, intercambiables y disponibles. También impide la lixiviación de los fertilizantes amoniacales, porque el humus retiene el amonio en forma intercambiable y obtenible (Villanueva, 1987).

Otra de las propiedades del humus es su capacidad para reaccionar con cationes metálicos para formar complejos, algunos de los cuales son solubles y algunos insolubles. La estabilidad de estos complejos varía con el pH pero se ha reportado como (Wild, 1993):



### **2.2.1. Como aceptor final de electrones en la respiración microbiana.**

Un aceptor de electrones es aquella sustancia que puede aceptar electrones de otra sustancia y que se reduce durante el proceso. Por lo tanto, un donador de electrones es aquella sustancia que puede ceder electrones a un aceptor y que se oxida durante el proceso (Madigan, 2004).

Lovley, *et al.* (1996a) reportaron por primera vez que el humus podría jugar un papel importante en el transporte de electrones durante la respiración anaerobia de microorganismos. 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<sub>2</sub>, está acoplada a la reducción de las quinonas en el humus a sus correspondientes hidroquinonas (forma reducida de las quinonas).

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. Se ha reportado que muchos inóculos originados de plantas de tratamiento de aguas residuales, sedimentos marinos, sedimentos contaminados o ricos en materia orgánica y suelos con diferentes características pueden oxidar una gran variedad de sustratos acoplado a la reducción de sustancias húmicas (Cervantes *et al.*, 2000; Coates *et al.*, 1998). Entre los sustratos oxidados durante estos estudios están acetato, lactato, etanol, fenol, glucosa, hidrógeno, propionato, piruvato, entre otros.

#### **2.2.1.1. Contaminantes.**

En la actualidad existe una gran diversidad de compuestos que se utilizan para la fabricación de una variedad de objetos que nos rodean, es el caso de los polímeros. El desarrollo de los procesos mediante los cuales se fabrican los polímeros sintéticos han sido más que ningún otro factor aislado, el responsable del crecimiento de la industria química en el siglo XX. Sin embargo, algunos científicos han estado expresando su preocupación a la largo de los años, sobre la dependencia que se ha

desarrollado respecto a estos materiales fabricados por el hombre. Como son productos de procesos de laboratorio e industriales y no de procesos que se lleven a cabo en la naturaleza, ésta no dispone de formas para deshacerse de ellos (Solomon, 1982).

**Tolueno.** Constituyente importante de la gasolina. Su relativamente alta solubilidad acuosa de 515 mg/L permite su movilidad en el ambiente. Dada la toxicidad de éste, es considerado como un contaminante prioritario por la Agencia de Protección al Ambiente (Van der Zee, 2001).

La degradación microbiana del tolueno ocurre bajo condiciones aeróbicas por una variedad de bacterias, utilizando enzimas para iniciar el ataque. Por otro lado, en ausencia de oxígeno, la degradación ha sido ligada a la metanogénesis, sulfato-reducción, desnitrificación y a la reducción de fierro(III). Esta degradación ocurre también por la reducción de óxido de manganeso y por un proceso de oxidación fermentativa con fumarato como aceptor de electrones. El mecanismo de la biodegradabilidad de tolueno bajo condiciones anaeróbicas se basa en que los microorganismos reductores del humus transfieren electrones de la oxidación del tolueno al óxido metálico por medio de la reducción del humus.

Otro de los contaminantes potenciales es el **cloruro de vinilo**, es un producto manufacturado que se usa para fabricar el cloruro de polivinilo, mejor conocido como PVC. También se origina de sustancias como tricloroetano y el tricloroetileno. El Departamento de Salud y Servicios Humanos (DHHS) ha determinado que el cloruro de vinilo es un reconocido carcinógeno en seres humanos (ATSDR, 1997).

Estudios recientes reportan que la oxidación microbiana del cloruro de vinilo y dicloroetano fue estimulada por la adición de ácidos húmicos, o AQDS como aceptor terminal de electrones. En ausencia de estos se presentó poca mineralización (Cervantes *et al.*,2001a).

Existen otros compuestos aromáticos que son muy recalcitrantes, tal es el caso del benceno, tolueno, fenol, entre otros. La oxidación de éstos compuestos es estimulada por el complejo formado por el humus y una vez reducidas las sustancias húmicas reaccionan con metales oxidados propiciando su reoxidación (figura 1).

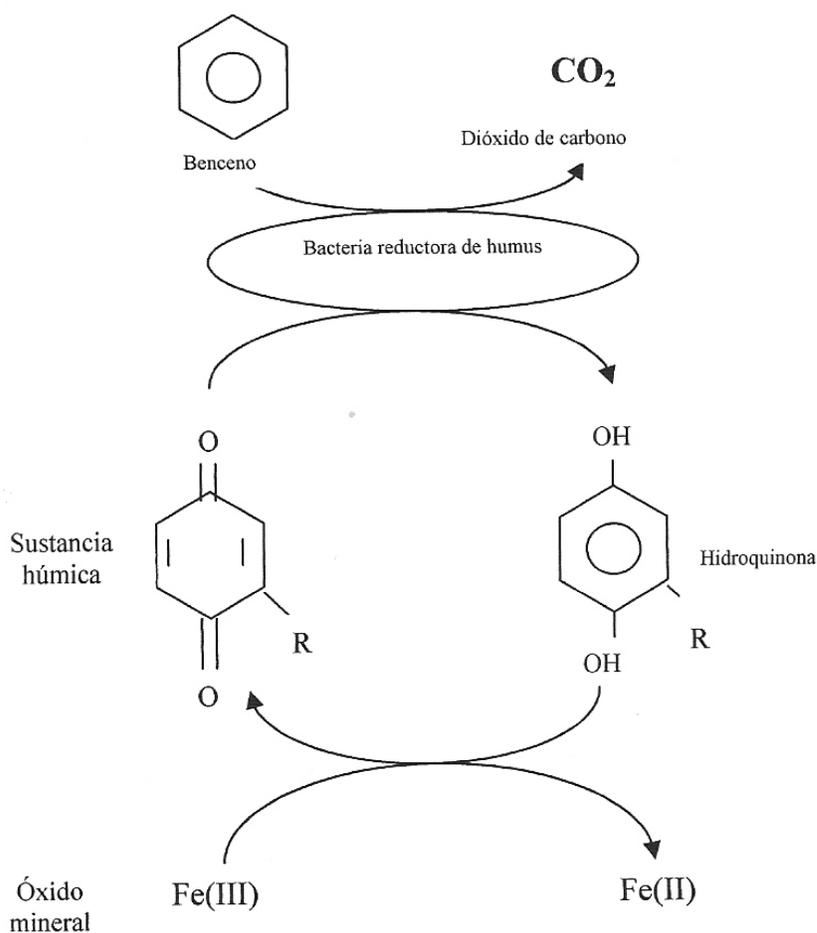


Figura 1. Reciclaje de quinonas en humus por óxidos minerales para la biodegradación de benceno (Lovley, *et al.*, 1996).



degradado por microorganismos que participan en consorcios metanogénicos (Wang et al., 1986). Adicionalmente, el fenol puede ser degradado anaeróbicamente por cultivos puros usando un aceptor de electrones alternativo como sulfato (Bak & Widdel, 1986), nitrato (Tschech & Fuchs, 1987) y hierro férrico (Lovley & Lonergan, 1990).

El hecho de que hay una amplia variedad de compuestos orgánicos que pueden ser utilizados por el consorcio de la respiración del humus (Field *et al.*, 2000) conduce a la pregunta de que si el humus o el modelo húmico puede también alcanzar la oxidación de compuestos fenólicos actuando como aceptor final de electrones (Cervantes et al., 2000).

**Metil-tertbutil-éter (MTBE).** Es un contaminante potencial de la industria, utilizado como aditivo de gasolina, el cual en presencia de Fe(III) como aceptor de electrones puede estimularse su biodegradación y aminorar el impacto de esta sustancia en el ambiente (Lovley, 1996).

### **2.2.2. Como mediadores redox (transportadores de electrones).**

Las quinonas en el humus no solamente pueden actuar como aceptores de electrones en la oxidación microbiana de muchos compuestos orgánicos. Las sustancias húmicas también pueden estimular la biotransformación de contaminantes conteniendo grupos electrofílicos, como los grupos azo y nitro, así como compuestos policlorados y metales radiactivos, a través del transporte de electrones entre una fuente externa de electrones y estos contaminantes (Figura 3). 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).

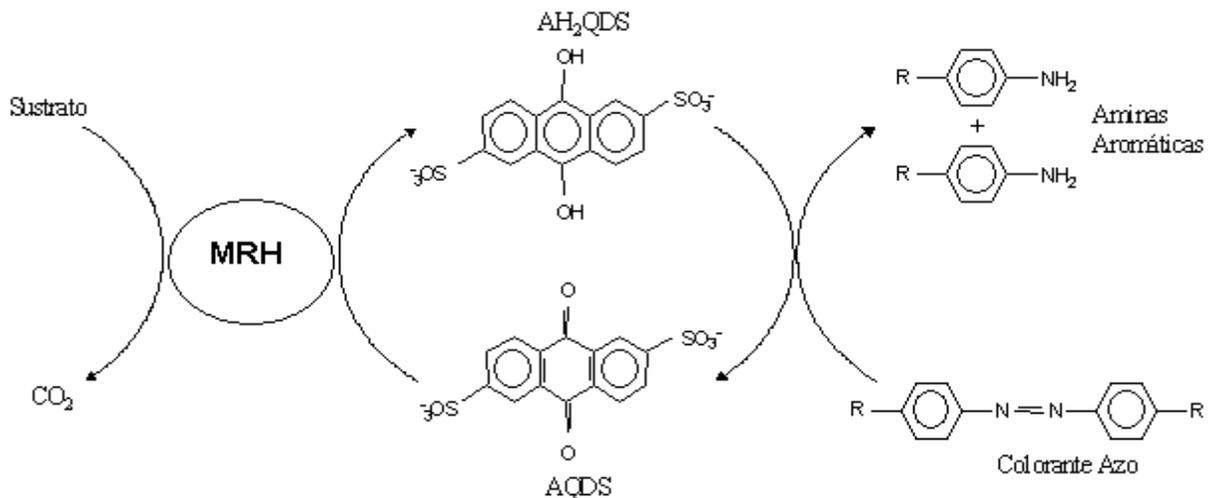


Figura 3. Mecanismo de reducción de colorantes azo a través del compuesto modelo AQDS (2,6-disulfonato de antraquinona). Los microorganismos reductores del humus (MRH) reducen las quinonas en el humus y las hidroquinonas formadas transfieren los electrones al grupo azo para reducirlo a aminas aromáticas (Field *et al.*, 2000).

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 (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) o la vernadita (MnO<sub>2</sub>), permitiendo con ello su regeneración al estado oxidado (Lovley *et al.*, 1996). 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 microorganismos reductores de humus (MRH). 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 (Benz *et al.*, 1998; Cervantes *et al.*, 2002). Existen microorganismos que no son capaces de reducir óxidos férricos directamente, pero que al estar presentes las quinonas como acarreadores de electrones, logran acoplar este proceso a la oxidación de diferentes sustratos (Benz *et al.*, 1998; Cervantes *et al.*, 2002).

La reducción química de **hexacloroetano** a tetracloroetileno por medio de diferentes agentes reductores (sulfuro,  $\text{Fe}^{2+}$  y azufre elemental), fue acelerada hasta diez veces por la adición de diferentes quinonas en los medios de reacción (Curtis & Reinhard, 1994). La reducción química de octaclorodibenzo-*p*-dioxinas (octa-CDDs) a sus respectivos tetra-CDDs solamente pudo ser llevada a cabo cuando diferentes análogos del humus fueron incluidos en los sistemas de reacción, mientras que no hubo conversión en la ausencia de las sustancias húmicas (Barkovskii & Adriaens, 1998).

Algunos **contaminantes policlorados** pueden ser degradados en presencia del humus como acelerador de los procesos biológicos. La conversión de tetracloruro de carbono a cloroformo ocurrió a una velocidad mayor cuando se adicionó materia orgánica del suelo a cultivos de la bacteria *Shewanella putrefaciens*. Se encontró que la fracción de ácidos húmicos en la materia orgánica fue la que contribuyó en mayor medida a la aceleración del proceso (Collins & Picardal, 1999). La adición de AQDS, a niveles por debajo del estequiométrico, a incubaciones de un lado granular aumentó hasta siete veces la velocidad de conversión de tetracloruro de carbono, permitiendo una mayor producción de cloruro a partir de este contaminante (Cervantes *et al.*, 2004). Lo anterior indica que las quinonas contribuyen a aumentar no solamente la velocidad de conversión de compuestos clorados, sino también, el grado de mineralización. A partir de este lado granular se obtuvo un enriquecimiento bacteriano capaz de acoplar la reducción de sustancias húmicas a la conversión de tetracloruro de carbono usando diferentes sustratos como fuente de electrones.

Los **colorantes tipo azo** son otro tipo de contaminantes que pueden ser convertidos aceleradamente por medio del humus o compuestos análogos (quinonas). Debido a que el enlace  $-\text{N}=\text{N}-$  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). 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. Estos resultados tienen importantes implicaciones en el tratamiento de aguas residuales de la industria textil, ya que es posible lograr un proceso decolorante eficiente aún cuando se opera el reactor a un corto tiempo de residencia hidráulico (Cervantes *et al.*, 2001c; Laszlo, 2000; Van der Zee *et al.*, 2001).

Otro grupo de contaminantes que requieren condiciones reductoras para ser convertidos, son los compuestos aromáticos que contienen uno o más grupos nitro (**nitroaromáticos**). 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.*, 1992; Schwarzenbach *et al.*, 1990).

La reducción de **metales radiactivos**, como Uranio(VI) y Tecnecio (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).

### 2.2.3. Como donadores de electrones.

El humus puede actuar como donador de electrones para la reducción de aceptores de electrones que presenten un potencial redox más positivo. Los microorganismos reductores del humus y los reductores de hierro III oxidan el humus reducido y/o al compuesto análogo reducido 2,6 disulfonato de antrahidroquinona AHQDS, usando nitrato y/o fumarato como aceptor de electrones (Figura 4). Los microorganismos involucrados en este proceso son: *Geobacter metallireducens*, *Geobacter sulphurreducens*, *Geothrix fermentans*, *Shewanella alga* y *Wollinella succinogenes*. (Lovley, et.al. 1996).

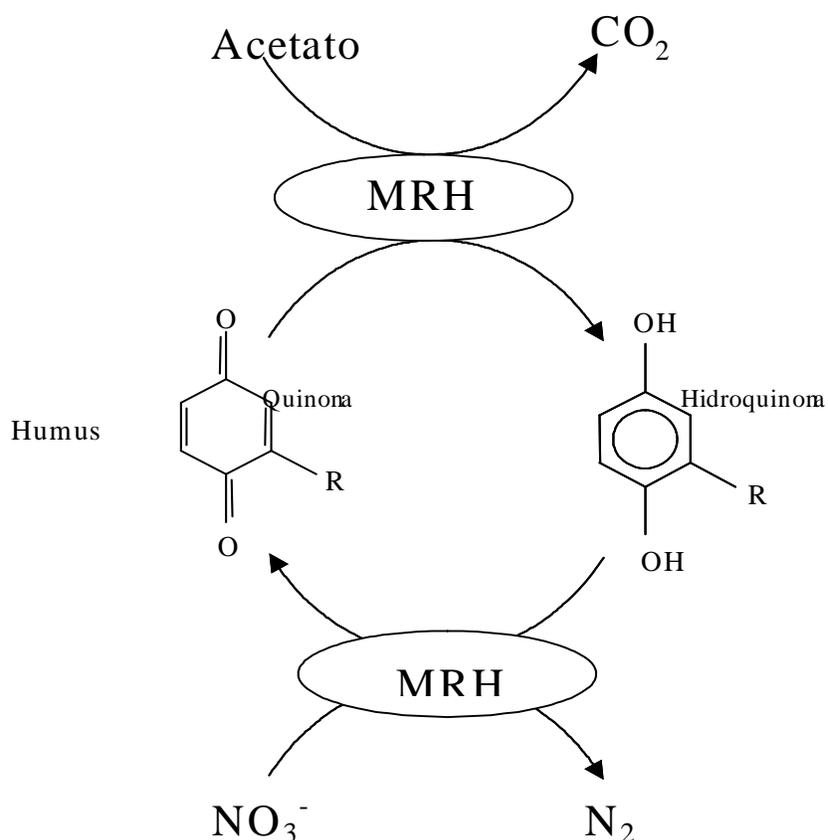


Figura 4. Oxidación de acetato por microorganismos reductores del humus (MRH) acoplado a la bioreducción del nitrato en la que participan las hidroquinonas como donadores de electrones (Coates et al., 1998; Lovley et al., 1996a).

Coates, *et al.* (1998), menciona que existe una diversidad de microorganismos en diferentes ambientes anaerobios capaces de llevar a cabo la desnitrificación. En otros estudios se encontró que *Paracoccus denitrificans* puede llevar a cabo la reducción del nitrato a nitrógeno molecular mediante la oxidación del AHQDS. En adición, *Wolinella succinogenes* puede reducir arsenato o selenato utilizando el AHQDS como donador de electrones (Lovley *et al.*, 1999). También se ha encontrado que la cepa CKB utilizada en los tratamientos de desechos de la industrial del papel, puede reducir el clorato ( $\text{ClO}_3^-$ ) teniendo al AHQDS como donador de electrones (Bruce *et al.*, 1999).

Los tres roles de las sustancias húmicas se resumen en la siguiente figura:

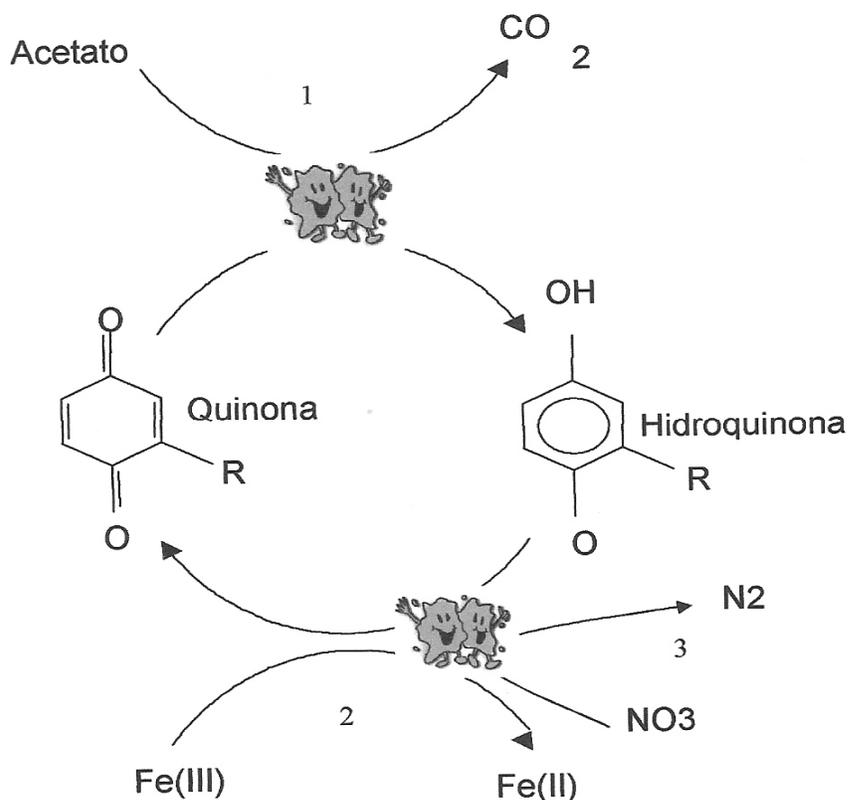


Figura 5. Reacciones microbianas y abióticas en un ciclo de las quinonas en el humus: 1) oxidación anaeróbica de un sustrato orgánico; 2) Oxidación abiótica de humus reducido por un óxido metálico Fe (III); 3) Humus reducido como donador de electrones para la reducción microbiana de una aceptor de electrones oxidado (Cervantes, 2002).

### **2.3. Aplicación del humus en sitios contaminados.**

Investigaciones realizadas por Anderson & Lovley (1999), sugieren que la adición de humus o AQDS a diferentes sedimentos contaminados con petróleo puede estimular la biodegradación de benceno en estos sitios. También se cree que la adición de AQDS a un sedimento contaminado permite la biodegradación de metil-terbutil éter (MTBE), el cual es un aditivo de la gasolina (Finneran & Lovley, 2001). En todos estos casos, los sedimentos han presentado una alta concentración de Fe(III) en diferentes formas, lo cual ha permitido reciclar las quinonas del humus durante el proceso de degradación.

Un sedimento fue incapaz de degradar tolueno cuando se adicionó óxido férrico como aceptor de electrones. La degradación del tolueno se llevó a cabo cuando se le adicionó al sistema una baja concentración de ácidos húmicos. Así se demostró que la conversión del tolueno estuvo acoplada a la reducción del Fe (III) en presencia de los ácidos húmicos (Cervantes *et al.*, 2001a).

#### **2.3.1. Ventajas de utilizar el humus en biorremediación.**

- E humus es muy abundante y su obtención no representa una inversión mayor, tal como la que se requiere para inyectar oxígeno a acuíferos contaminados mediante técnicas aerobias.
- Las propiedades inertes del humus garantizan que su aplicación a sitios contaminados no conlleva a la acumulación de intermediarios o productos indeseables. Algunas otras tecnologías necesitan de la inyección de nitrato o

sulfato, los cuales pueden ocasionar problemas de eutroficación, cuando se aplican para la degradación de contaminantes (Anderson & Lovley, 2000; Hutchins *et al.*, 1991).

- Mayor solubilidad que presentan las sustancias húmicas en el agua respecto a otros aceptores de electrones alternos ( $O_2$ , Fe(III) y Mn(IV)), lo cual asegura un buen transporte y disponibilidad para los microorganismos involucrados.
- Propiedades del humus para absorber metales pesados y compuestos orgánicos que también contribuyen a una mayor disponibilidad de los contaminantes (Stevenson, 1994).

#### **2.4. Microorganismos reductores del humus.**

La mayoría de los microorganismos reductores del humus (MRH) son bacterias reductoras de Fe(III) de la familia *Geobacteraceae* (Coates *et al.*, 1998; Lovley *et al.*, 1996b), pero la gran diversidad incluye también otros tipos de bacterias reductoras del Fe(III) como *Pantoea agglomerans* (Francis *et al.*, 2000) y *Thermoanaerobacter siderophilus* (Slobodkin *et al.*, 1999). Además, existen bacterias sulfato-reductoras, como *Desulfovibrio* G11, halorespiradoras, 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 (Benz *et al.*, 1998; Cervantes *et al.*, 2002). La tabla 1 resume la biodiversidad de microorganismos reportados en la literatura que son capaces de oxidar diferentes sustratos acoplado a la reducción de quinonas.

Tabla 1: Diversidad filogenética de microorganismos reductores de humus y/o AQDS (Field & Cervantes, in press)

<b>Filogenia</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Aceptor electrónico*</b>
<b>Archaea</b>		
<i>Metanococcales</i>	<i>Methanococcus thermolithotrophicus</i>	AQDS
	<i>Methanococcus voltairei</i>	AQDS
<i>Methanobacteriales</i>	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	AQDS
	<i>Methanobacterium palustre</i>	AQDS Y HA
<i>Methanosarcinales</i>	<i>Methanosarcina barkeri</i>	AQDS Y HA
	<i>Methanobolbus vulcani</i>	AQDS
	<i>Methanosphaera cuniculi</i>	AQDS Y HA
<i>Methanomicrobiales</i>	<i>Methanospirillum hungatei</i>	AQDS
<i>Methanopyrales</i>	<i>Methanopyrus kandleri</i>	AQDS
<i>Thermoproteales</i>	<i>Pyrobaculum islandicum</i>	AQDS Y HA
<i>Thermococcales</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>	AQDS
<i>Archaeoglobales</i>	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	AQDS
<b>Bacteria</b>		
<i>γ - Proteobacteria</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	AQDS
	<i>Shewanella alga</i>	AQDS Y HA
	<i>Shewanella putrefaciens</i>	AQDS
	<i>Shewanella sacchrophila</i>	AQDS
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	AQDS
	<i>Geospirillum barnseii</i>	AQDS
	<i>Wolinella succinogenes</i>	AQDS Y HA
	<i>Escherichia coli</i> K12	AQS Y L
<i>α - Proteobacteria</i>	<i>Sphingomonas xenophaga</i> BN6	AQS
<i>β - Proteobacteria</i>	<i>Ralstonia eutropha</i> 335	AQS
<i>δ - Proteobacteria</i>	<i>Geobacter metallireducens</i>	AQDS Y HA
	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	AQDS Y HA
	<i>Geobacter humireducens</i>	AQDS Y HA
	<i>Geobacter JW-3</i>	AQDS Y HA
	<i>Geobacter TC-4</i>	AQDS Y HA
	<i>Geobacter grbiciae</i>	AQDS
	<i>Desulfovibrio G11</i>	AQDS
	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	DMBQ, NQ
	<i>Desulfuromonas acetexigens</i>	AQDS
	<i>Desulfuromonas SDB-1</i>	AQDS
	<i>Desulfuromonas FD-1</i>	AQDS
	<i>Deinococcus radiodurans</i>	AQDS
	<i>Thermotoga marítima</i>	AQDS
	<i>Thermoanaerobacter siderophilus</i>	AQDS
	<i>Bacillus subtilis</i>	AQS, AQDS Y L
	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	HA
	<i>Enterococcus cecorum</i>	HA
	<i>Lactococcus lactis</i>	HA, ACNQ
	<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	AQDS Y HA
	<i>Desulfobacterium PCE1</i>	AQDS

AQDS, antraquinona 2,6 disulfonato; AQS, antraquinona 2 sulfonato; ACNQ, 2 amino-3-carboxi-1,4-naftoquinona; DMBQ, 2,6 dimetil-1,4- benzoquinona; L, lawsone (2-hidroxi-1,4 naftoquinona); HA, ácidos húmicos; NQ, naftoquinona.

## 2.5. Metanogénesis.

El metano es producido por la acción de las arqueobacterias metanogénicas que se desarrollan en ambientes anóxicos. Los sustratos empleados para la metanogénesis se clasifican en tres grupos generales: los sustratos monocarbonados, como el dióxido de carbono; los sustratos metílicos, como el metanol; y, los sustratos acetotróficos, como el acetato (Madigan *et. al.*, 2004).

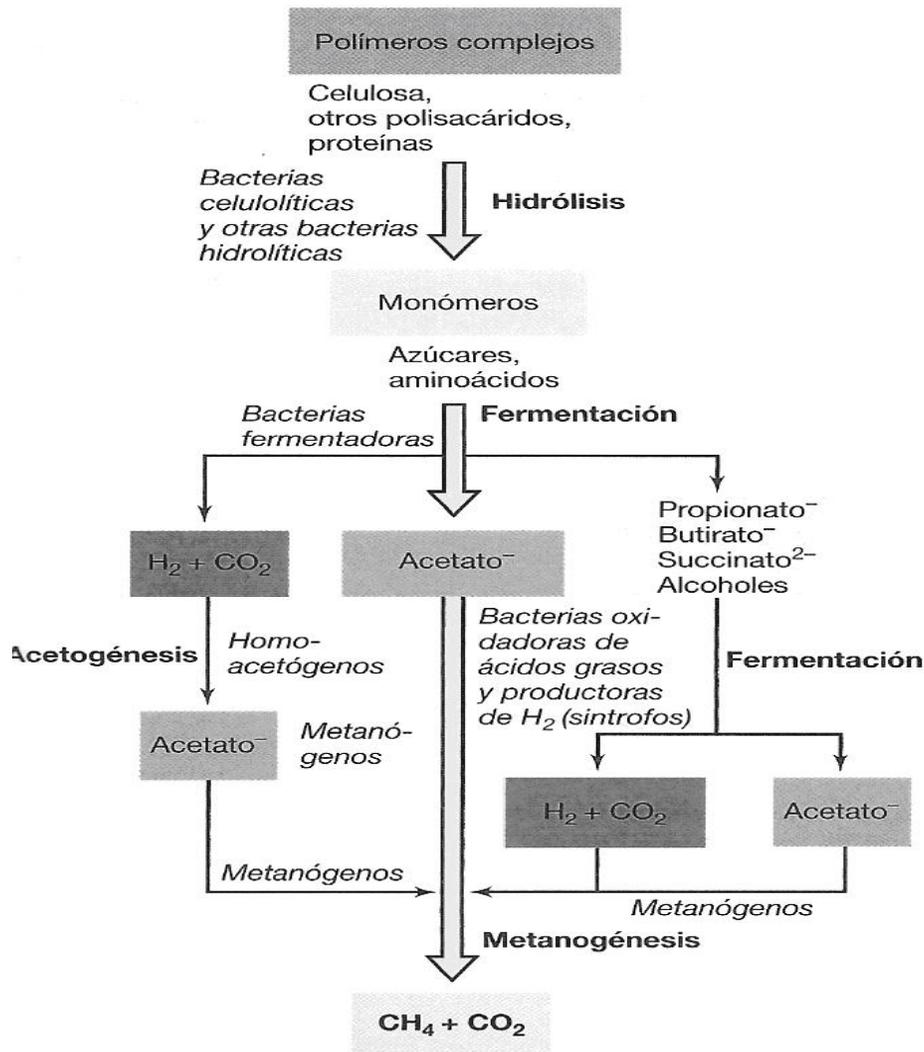


Figura 6. Proceso global de la descomposición anóxica, mostrando la forma en que varios grupos fermentativos actúan en la conversión de materiales orgánicos complejos a  $CH_4$  y  $CO_2$  (Madigan *et. al.*, 2004).

Los estudios sobre metanogénesis han demostrado que la producción biológica de metano tiene lugar a través de una serie exclusiva de reacciones en las que se clasifican como las que transportan la unidad de C<sub>1</sub> (molécula de dióxido de carbono que se introduce al ciclo) desde el sustrato inicial, CO<sub>2</sub>, hasta el producto final, metano; y las enzimas que en la reacción rédox suministran los electrones necesarios para la reducción de CO<sub>2</sub> a metano.

Un gran número de Euryarchaeota produce metano. Tales organismos se denominan metanógenos. Entre estos se encuentran los géneros *Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methamicrobium*, *Methanosarcina*, entre otros.

En la figura 6 se muestra como también los organismos sintrofios convierten los ácidos grasos y alcoholes en sustratos para la metanogénesis y acetogénesis. Cuando abundan otros aceptores de electrones alternativos, como el sulfato en los sedimentos marinos, prevalece la respiración anaeróbica, ya que los sintrofios no pueden competir por los ácidos grasos/alcoholes con las bacterias sulfato reductoras.

## 2.6. Desnitrificación.

Los compuestos nitrogenados inorgánicos actúan comúnmente como aceptores de electrones en la respiración anaeróbica. Las formas de nitrógeno inorgánico más frecuentes en la naturaleza son el amoníaco y nitrato. Uno de los aceptores de electrones alternativos más comunes es el nitrato, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, que se convierte a formas más reducidas del nitrógeno, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, N<sub>2</sub>O, NO y N<sub>2</sub> (Madigan *et. al.*, 2004).

La desnitrificación es un proceso respiratorio anaerobio en el que ocurre la reducción de nitrato a nitrógeno molecular. Consta de dos etapas: desnitratación y desnitrificación. En la primera el nitrato es reducido a nitrito, para ser reducido a su vez a nitrógeno molecular, formándose en etapas intermedias los óxidos nítrico y nitroso (Jetten *et al.*, 1997).

Coates, *et al.* (1998), menciona que existe una diversidad de microorganismos en diferentes ambientes anaerobios capaces de llevar a cabo la desnitrificación. Los géneros de bacterias desnitrificantes más comunes son: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Chrbacterium*, *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *halobacterium*, *Neisseria*, *Paracoccus*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Thiobacillus*, *Vibrio*, *Xanthomonas*, entre otras (Mateju *et al.*, 1992).

Estas bacterias son bioquímica y taxonómicamente muy diversas. La mayoría de estos géneros son heterótrofos, algunos utilizan fuentes unicarbonadas, otros crecen autotróficamente en hidrógeno y dióxido de carbono o en compuestos sulfurados reducidos (Knowles, 1982). Algunos de estos microorganismos poseen la enzima nitrato reductasa, necesaria para formar nitrógeno molecular a partir de nitrato, sin embargo, existen otros microorganismos que no poseen tal enzima, por lo que son llamados nitrito dependientes. Los microorganismos que no poseen la enzima óxido nitroso reductasa, obtienen por producto final  $N_2O$  (Halling-Sorensen, 1993).

Se han identificado dos tipos de nitrato reductasas, una enzima membranal de tres subunidades (120, 60 y 20 kDa) que emplea ubihidroquinona como donador de electrones y una enzima soluble que se localiza en el periplasma conteniendo dos subunidades (94 y 19 kDa) y que aún se desconoce su donador de electrones (Berks, *et al.* 1995). El mecanismo de acción de ambas enzimas no ha sido descrito

aún, pero se asume que la reducción de nitrato a nitrito ocurre en un átomo de hierro o molibdeno como centro (Stouthamer, *et al.* 1976).

La fase final del proceso desnitrificante se lleva a cabo en presencia de la enzima óxido nitroso reductasa. Esta enzima es severamente inhibida por la presencia de oxígeno (Ferguson, 1994).

## 2.7. Sulfato – reducción.

El sulfato, la forma más oxidada del azufre, es uno de los aniones mayoritarios del agua de mar y es usado por las bacterias sulfato-reductoras. El producto final de la reducción del sulfato es SH<sub>2</sub>. El sulfuro de hidrógeno es el principal gas volátil de azufre que se forma principalmente por reducción bacteriana de sulfato ( $\text{SO}_4^{-2} + 8\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{S} + 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{OH}^-$ ). Muchas bacterias son capaces de crecer sobre acetato como única fuente de carbono, la mayoría de estos organismos son de origen marino (Madigan, *et. al* 2004).

La sulfato-reducción es un proceso respiratorio anaerobio donde el sulfato es usado como aceptor de electrones, pero tiene menor capacidad aceptora que O<sub>2</sub> y NO<sub>3</sub>. Al igual que la desnitrificación, esto difiere por los procesos de asimilación de compuestos sulfurados en el material celular. Muchas bacterias y arqueobacterias pueden desasimilar la reducción de azufre.

Los microorganismos que pueden participar en este tipo de reacciones son de los géneros: *Desulfobacterium*, *Desulfobacter*, *Desulfonema*, *Desulfosarcina*,

*Archaeoglobus* y *Desulforhabdus*. La reducción incompleta del sulfato puede darse con *Desulfomicrobium*, *Desulfobulbus*, *Desulfobotulus*, *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum*. Los donadores de electrones más comunes son: ácidos orgánicos, ácidos grasos, alcoholes e hidrógeno (Vallero, *et al* 2003),

Además, existen bacterias sulfato-reductoras, como *Desulfovibrio* G11, halorespiradoras, 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 (Benz, *et al.*, 1998; Cervantes, *et al.*, 2002).

## **CAPÍTULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Ubicación de los experimentos.**

Los experimentos se llevaron a cabo en los laboratorios de ecodesarrollo y análisis especiales del ITSON, en el periodo de Enero a Julio de 2006.

#### **3.2. Inóculos y sustrato.**

Se exploraron dos tipos de inóculos: un sedimento de un humedal procedente de un manglar de la Bahía de Tóbari, y un lodo granular anaerobio procedente de una planta tratadora de aguas residuales.

Durante su almacenamiento, el lodo se mantuvo en refrigeración a 4°C y, cuando fué necesario se reactivó colocándolo en un biorreactor anaerobio, bajo las condiciones que serán descritas en la sección 3.3.

Con el fin de establecer la cantidad de lodos a emplear en los bioensayos, se determinó el contenido de sólidos suspendidos totales (SST), los sólidos suspendidos volátiles (SSV) y los sólidos suspendidos fijos (SSF).

Los SST se determinaron tomando 10 g (para cada repetición) de lodo previamente tamizado (tamiz #40) y se colocó en un crisol puesto previamente a peso constante; posteriormente se mantuvieron en el horno a una temperatura de 103-105°C hasta que el peso no presentó variación; se determinó el peso y se obtuvo el valor de los SST. Enseguida, se introdujeron los crisoles en un mufla a 500°C, 30 minutos, hasta obtener valores constantes de peso; el valor obtenido corresponde a los SSF. Los SSV se obtienen de la diferencia entre los SST y SSF (Estándar Métodos, 1995).

Como sustrato se utilizó Fenol (1.5 mM) y *p*-cresol (1.5 mM). La cantidad inicial de los dos sustratos se calculó en base a 335.6 mg de Demanda Química de Oxígeno (DQO) por litro, en todos los casos.

### **3.3. Medio basal.**

El medio basal que se utilizó para la reactivación de los inóculos contiene (g/L): NaHCO<sub>3</sub> (2), NH<sub>4</sub>Cl (0.1), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.05), MgCl\*6H<sub>2</sub>O (0.012), CaCl\*2H<sub>2</sub>O (0.005); Na<sub>2</sub>S (0.013); 1 ml l<sup>-1</sup> de elementos traza y vitaminas. El medio basal fue flujado con N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20) durante 3 minutos antes de su uso.

Las botellas se incubaron a 30 °C y el pH se mantuvo a 7.3 ± 0.2 mediante el sistema de amortiguamiento bicarbonato/CO<sub>2</sub>. El tiempo de incubación fue de 15-30 días.

### 3.4. Diseño experimental.

Para todos los experimentos, se usaron botellas serológicas de vidrio de 120 ml, en las cuales se depositó el inóculo (10 g/l en peso seco), medio basal (60 ml), con o sin fuente de fenol (1.5 mM), 2,6 disulfonato de antraquinona AQDS (2.5mM), nitrato de potasio (1mM), sulfato de sodio (0.625mM), inyectando una atmósfera de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20) en el espacio de cabeza. A cada botella se le dejó un espacio de cabeza de 60 ml. Con el fin de mantener condiciones anóxicas las botellas fueron selladas con tapones de hule y un seguro de aluminio.

El experimento consta de 7 tratamientos (tabla 2). Las constantes en todos los casos son el medio basal (con bicarbonato 2 g/l), el inóculo (10 g/l en peso seco) y la concentración de contaminante (fenol 2.5 mM).

Tabla 2. Tratamientos

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
AQDS	No	Si	No	No	Si	Si	Si
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	No	No	Si	No	Si	No	Si
NO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	No	No	No	Si	No	Si	Si

En todos los experimentos se incluyó controles endógenos por duplicado con el fin de diferenciar la actividad en los medios con y sin la presencia del contaminante. Todas las condiciones de cultivo se realizaron por triplicado con el fin de verificar la reproducibilidad de los resultados.

Se tomaron muestras cada dos días durante la primer semana y cada 5 la segunda semana, a las cuales se les hicieron las siguientes determinaciones, descritas en la sección 3.5.

### 3.5. Métodos analíticos.

- La reducción de sustancia húmicas se midió por método colorimétrico bajo condiciones anaerobias (cámara anaerobia), en un espectrofotómetro marca Génesis 20 Thermospectronics a una longitud de onda de 450 nm. La cámara anaerobia (marca COY modelo 14500) se usó para propiciar condiciones anaeróbicas en la misma, se utilizó una atmósfera formada por N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> (95/5), así como la presencia de un catalizador de paladio para asegurar la ausencia de oxígeno.
- El consumo de los compuestos fenólicos fue cuantificado por la técnica de DQO al inicio y al final de cada experimento.
- Las concentraciones de nitrato, nitrito y sulfato se determinó mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC marca Waters Alliance) por el método de determinación de aniones. Para llevar a cabo esta determinación se tomaron muestras de cada tratamiento, se centrifugaron a 8500 rpm por 20 min. Las muestras se colocaron en los viales correspondientes y se congelaron hasta el momento del análisis.

Se empleó una columna para aniones de alta resolución, marca Water IC-Pack™; y un detector de conductividad, del mismo fabricante, modelo 432.

El eluyente que se empleó fue borato/gluconato de sodio, para ello se preparó una solución concentrada de borato/gluconato de sodio, descrita en el manual del equipo (HPLC marca Waters Alliance), que posteriormente se preparó una segunda solución: 20 ml solución concentrada borato/gluconato de sodio, 20 ml de n-butanol y 120 ml de acetonitrilo se afora a 1000 ml con agua desionizada, y se procede a filtrar al vacío con papel Watman #1, finalmente se sonicó antes de su uso en el equipo de HPLC, con el fin de desplazar el oxígeno disuelto en la solución, para evitar interferencias en las mediciones.

- La producción de metano fue medida por cromatografía de gases, por el método establecido para la determinación de biogás, utilizando un CG marca VARIAN 3800. El cromatógrafo cuenta con un detector de conductividad térmica (TCD) y una columna Porapak Q con una malla 80/100. Las temperaturas de operación de la columna, el inyector y el detector fueron 35, 170 y 190°C respectivamente. Se obtuvo el análisis cuantitativo de metano en cada muestra que se inyectó, calculando el área bajo la curva.

Tales determinaciones sirven para saber cantidades de productos consumidos y generados, y cómo esto se ve influenciado por la presencia del humus.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Resultados.

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos de 4 diferentes experimentos, descritos en Materiales y Métodos. El objetivo de los experimentos fue explorar la capacidad de dos consorcios anaerobios distintos para oxidar sustratos ecológicamente importantes (fenol y *p*-cresol) en presencia de diferentes aceptores de electrones (bicarbonato, nitrato, sulfato y AQDS). Lo anterior permitirá predecir el papel que juegan las bacterias reductoras del humus (quinonas) en la degradación de diferentes compuestos orgánicos, cuando actúan en presencia de aceptores de electrones alternos (bicarbonato, sulfato y nitrato).

#### A) Experimentos con lodo granular anaerobio

La conversión parcial de fenol a metano fue observada en los experimentos que se llevaron a cabo, con y sin la presencia de AQDS,  $\text{SO}_4^{-2}$  y  $\text{NO}_3^-$ , por el lodo granular anaerobio (Figura 7).

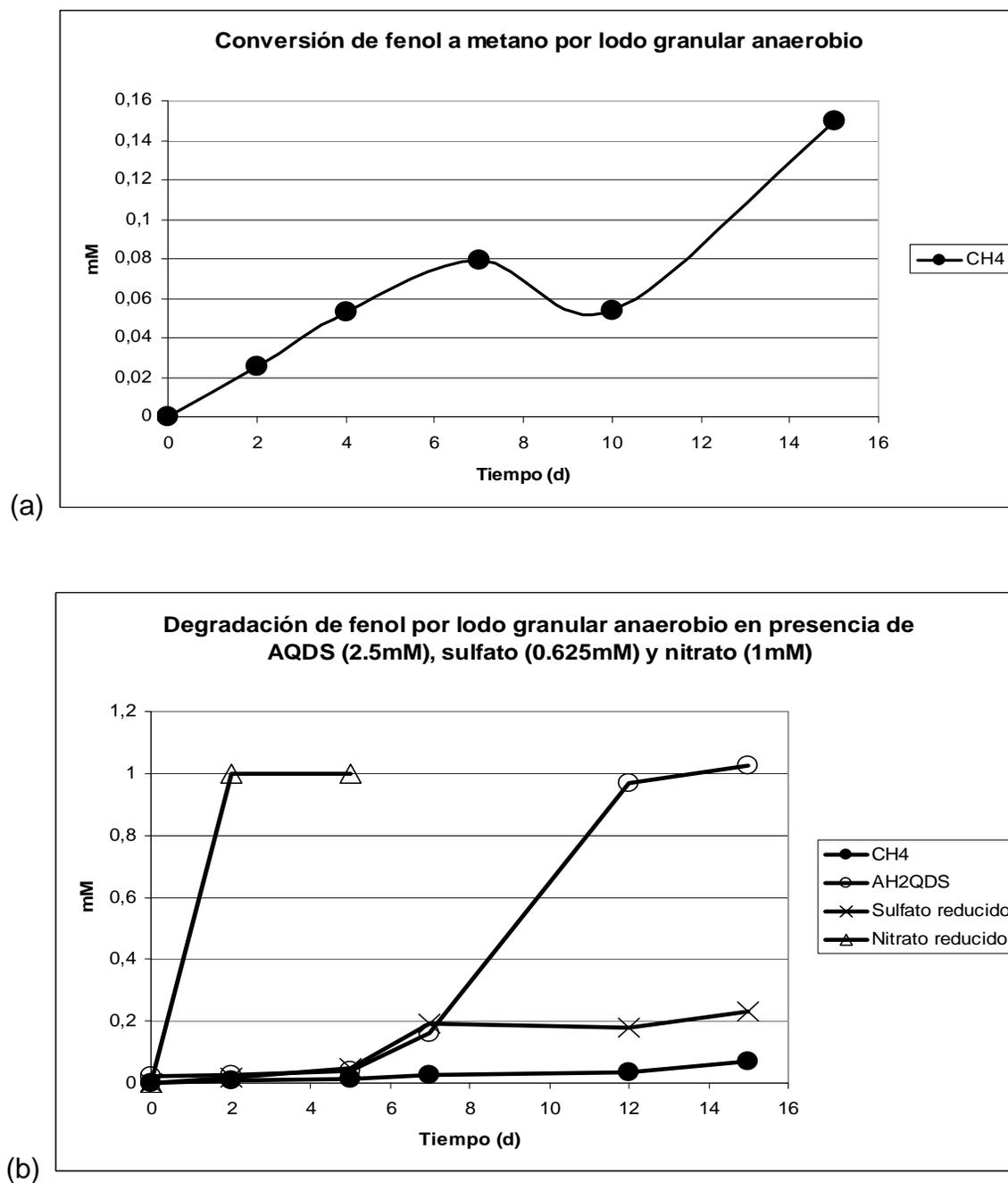


Figura 7. Productos obtenidos en la degradación de fenol en ausencia (a) y en presencia de AQDS,  $\text{SO}_4^{-2}$  y  $\text{NO}_3^-$  (b).

A partir de aproximadamente dos días de incubación la degradación de los compuestos fenólicos tomó lugar en ambos bioensayos. La biodegradación de estos

compuestos se evidencia por la reducción de los distintos aceptores de electrones incluidos (nitrato, sulfato, y AQDS) o por la producción de metano, ya que estos procesos no fueron observados cuando no se incluyó fenol en el medio (cultivos endógenos).

Se observó que la reducción del nitrato fue el proceso respiratorio predominante en los primeros días de incubación, siendo aproximadamente a los 2 días de incubación que se reduce por completo este aceptor de electrones. Inmediatamente después de la reducción total del nitrato, se observa que comienza la reducción del AQDS. La reducción de sulfato es similar a la reducción de AQDS mientras la desnitrificación toma lugar, pero después de que esta termina, la reducción de AQDS prevalece sobre la reducción de sulfato y, la producción de metano es de sólo 0.06 mM al finalizar el experimento (Figura 7b).

El 88% de fenol fue consumido después de 15 días de incubación por el lodo granular anaerobio, cuando el único aceptor final de electrones era el bicarbonato, mientras que sólo el 65% de fenol fue degradado por el mismo lodo en presencia de AQDS,  $\text{SO}_4^{-2}$  y  $\text{NO}_3^-$ , en el cuál hubo producción de metano insignificante (Tabla 3).

Por otra parte, el *p*-cresol fue también parcialmente degradado después de 30 días de incubación por el lodo granular anaerobio, aunque solamente el 64% fue consumido en condiciones metanogénicas. Por otro lado, en presencia de de AQDS,  $\text{SO}_4^{-2}$  y  $\text{NO}_3^-$ , se degradó el 71% de este contaminante y el nivel de metano producido fue insignificante al igual que en el caso de fenol. Durante los primeros días de incubación se observó una competencia entre la desnitrificación y la reducción de AQDS. Una vez que se redujo todo el nitrato, se observó una fase de latencia en la reducción de AQDS, misma que se reactivó en los siguientes 10 días

de incubación. La reducción de sulfato y la metanogénesis jugaron un papel insignificante durante el proceso de degradación del *p*-cresol. (Figura 8).

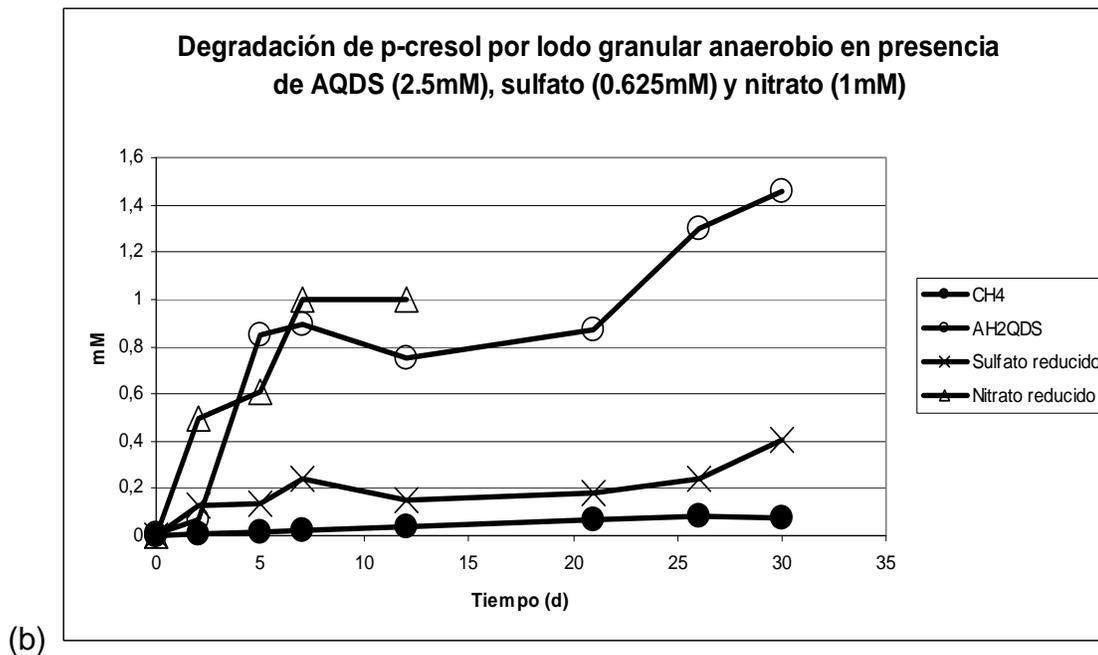
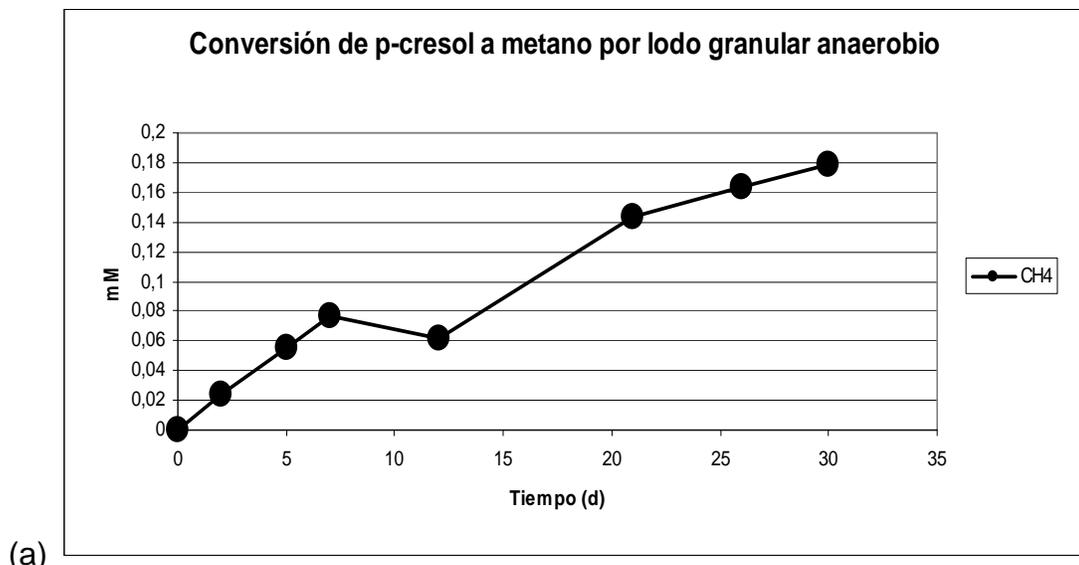


Figura 8. Productos obtenidos de la degradación de *p*-cresol por un lodo granular anaerobio en ausencia (a) y en presencia de AQDS,  $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{NO}_3^-$  (b).

## B) Experimentos con sedimento de un manglar

Cuando el inóculo empleado para la degradación de fenol fue el sedimento de un manglar el proceso que prevaleció fue otra la vez la desnitrificación, seguida de la sulfato reducción en última instancia por la reducción de AQDS y metanogénesis (Figura 9).

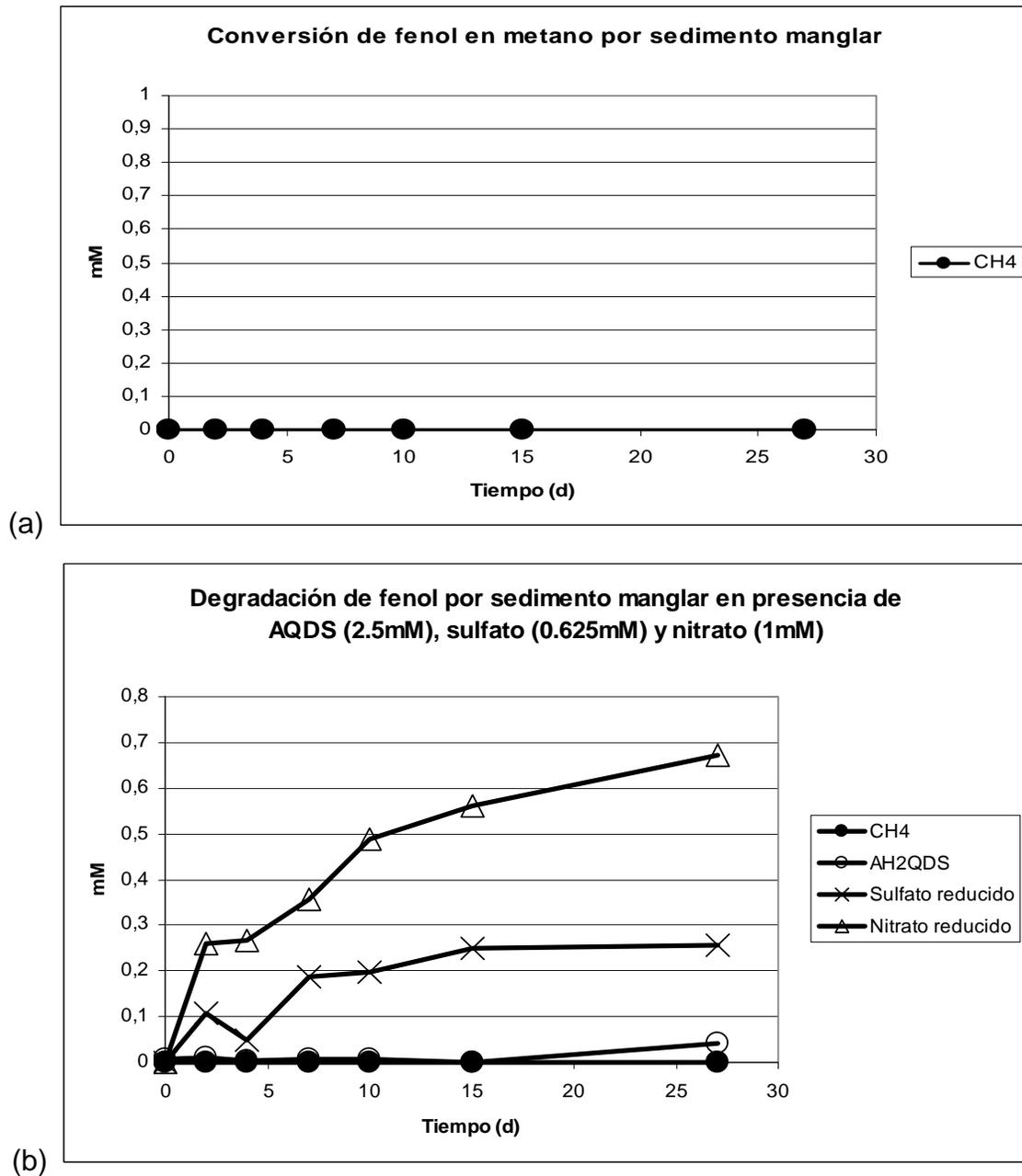


Figura 9. Productos obtenidos de la degradación de fenol por el sedimento de un manglar en ausencia (a) y en presencia de AQDS,  $\text{SO}_4^{-2}$  y  $\text{NO}_3^-$  (b).

Al emplear el sedimento del manglar en la degradación de *p*-cresol, la metanogénesis fue nula y la reducción de AQDS insignificante mientras que los procesos predominantes fueron la reducción del nitrato sobre la reducción del sulfato (Figura 10).

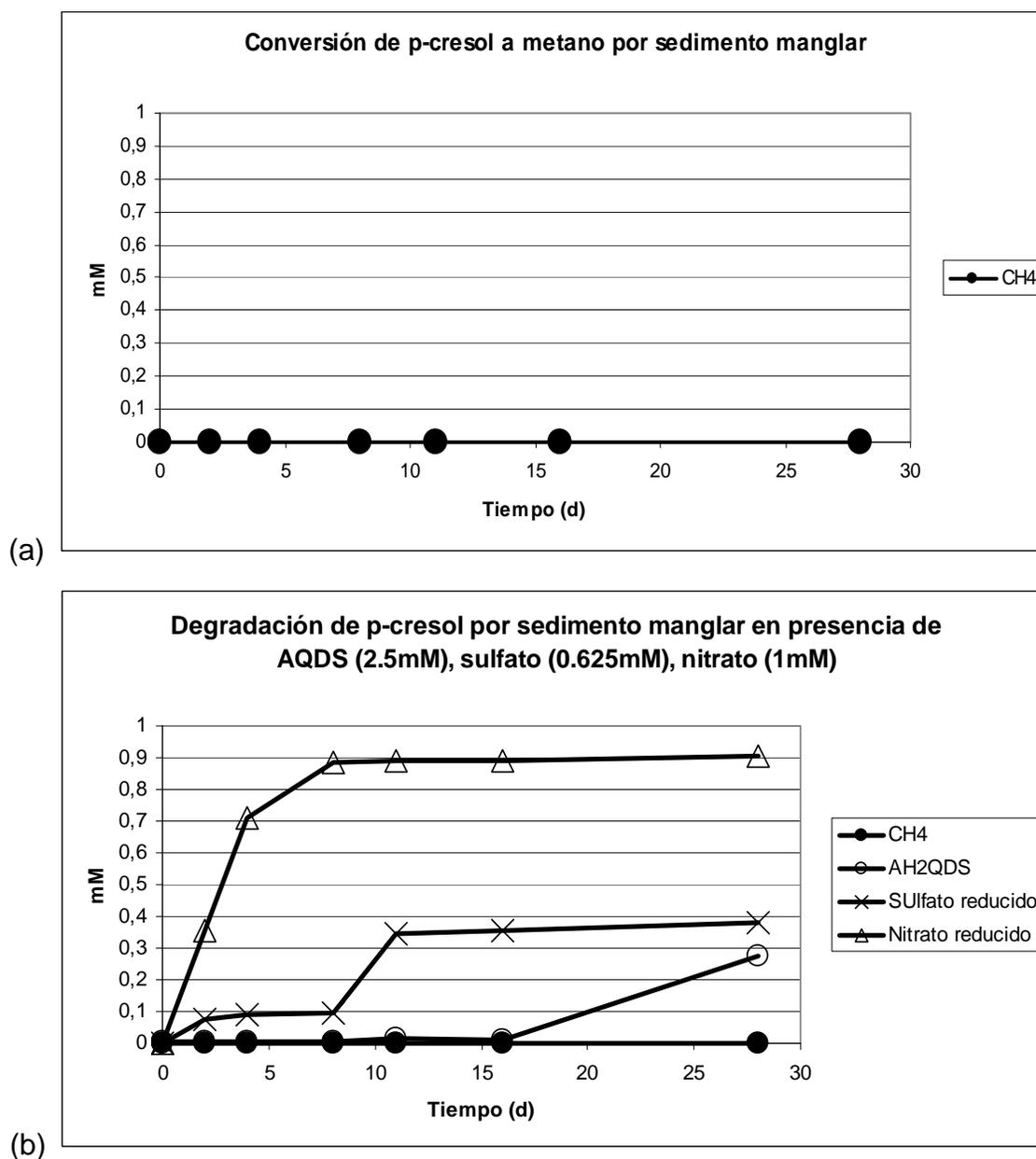


Figura 10. Productos obtenidos de la degradación de *p*-cresol por un sedimento de un manglar en ausencia (a) y en presencia de AQDS,  $\text{SO}_4^{-2}$  y  $\text{NO}_3^-$  (b).

La baja recuperación observada de fenol y *p*-cresol en el balance (Tabla 3) sugiere que estos compuestos fenólicos fueron convertidos, por estos consorcios, también en otros intermediarios no identificados.

En los experimentos en los que se empleó sedimento del manglar, se observa un periodo de tiempo notoriamente más largo que con lodo granular anaerobio para iniciar los procesos reductivos de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{SO}_4^{2-}$  (Figuras 9b y 10b).

Tabla 3. Grado de degradación y recuperación de sustratos consumidos para fenol y *p*-cresol por lodo granular anaerobio y sedimento de manglar.

Condiciones	Grado de degradación (%) <sup>a</sup>		Cociente de productos reducidos (% Recuperación) <sup>b</sup>	
	Lodo granular anaerobio	Sedimento manglar	Lodo granular anaerobio	Sedimento manglar
Fenol	88.24	61.98	3.28	0.00
Fenol - AQDS	71.9	33.33	7.56	0.25
Fenol - $\text{SO}_4^{2-}$	45.38	73.17	27.60	7.58
Fenol - $\text{NO}_3^-$	82.05	74.79	16.90	11.51
Fenol - AQDS - $\text{SO}_4^{2-}$	53.72	62.02	19.11	8.82
Fenol - AQDS - $\text{NO}_3^-$	54.17	51.24	33.03	13.38
Fenol - AQDS - $\text{SO}_4^{2-}$ - $\text{NO}_3^-$	64.96	31.15	35.81	41.20
<i>p</i> -cresol	64.71	40.91	5.33	0.00
<i>p</i> -cresol - AQDS	59.5	28.33	13.44	0.14
<i>p</i> -cresol - $\text{SO}_4^{2-}$	78.51	47.54	15.77	6.91
<i>p</i> -cresol - $\text{NO}_3^-$	94.07	51.61	15.33	21.75
<i>p</i> -cresol - AQDS - $\text{SO}_4^{2-}$	63.93	45.6	28.40	12.63
<i>p</i> -cresol - AQDS - $\text{NO}_3^-$	76.8	36.51	22.18	21.41
<i>p</i> -cresol - AQDS - $\text{SO}_4^{2-}$ - $\text{NO}_3^-$	71.31	67.19	38.97	27.12

<sup>a</sup> %Degradación =  $(\text{DQO}_{\text{inicial}} \text{ fenol o } p\text{-cresol} - \text{DQO}_{\text{final}} \text{ fenol o } p\text{-cresol}) / (\text{DQO}_{\text{inicial}} \text{ fenol o } p\text{-cresol})$

<sup>b</sup> %Recuperación =  $(\text{productos obtenidos}) / (\text{fenol o } p\text{-cresol consumido})$

La degradación de fenol esta acoplada también a la reducción de AQDS, pero en menor grado comparado con las condiciones metanogénicas (Tabla 3).

Cuando se incluyó  $\text{NO}_3^-$  en presencia de fenol-AQDS, el grado de degradación de fenol por el lodo granular anaerobio fue levemente menor, mientras que con el sedimento del manglar fue levemente mayor. De manera similar se observó al

adicionarse  $\text{SO}_4^{-2}$  al medio, siendo la actividad de éste menor a la desnitrificante. El comportamiento fue el mismo en el caso de la degradación de *p*-cresol, a diferencia que la actividad con este último sustrato se registró en menor cantidad de productos obtenidos.

#### 4.2. Discusión.

La observación de que la degradación de fenol y *p*-cresol ocurre bajo condiciones metanogénicas es consistente con numerosos reportes anteriores, los cuales indican que estos contaminantes pueden ser utilizados por consorcios metanogénicos (Boyd et al. 1983; Dwyer et al. 1986; Wang et al. 1989; Tawfiki et al. 2000).

El período de tiempo que tarda en iniciar la degradación de estos contaminantes se debe al tipo de inóculo utilizado, que no fue previamente expuesto a los contaminantes fenólicos. Este periodo es el mismo tiempo requerido para el crecimiento de las bacterias responsables de la degradación y desarrollo de los sistemas enzimáticos involucrados en la ruta de degradación.

En este estudio se observó que tanto los iones nitrato y sulfato así como las quinonas pueden ser utilizados como aceptor de electrones alterno en apoyo a la oxidación anaerobia de fenoles.

La adición de AQDS al consorcio microbiano previene la metanogénesis. Esto puede deberse a el hecho de que AQDS fue inhibitorio para los metanógenos ó, que AQDS fue el aceptor de electrones preferido sobre el bicarbonato. AQDS aumenta el

potencial redox de los cultivo (dato no mostrado). Este alto potencial redox probablemente interfiere con los procesos bioquímicos requeridos para la metanogénesis. Sin embargo, se observó también que  $\text{NO}_3^-$  fue el aceptor de electrones preferido sobre AQDS,  $\text{SO}_4^{2-}$  y bicarbonato, creándose una especie de simbiosis en el medio, ya que una vez que la disponibilidad de  $\text{NO}_3^-$  se agotó en el medio, ésta dio lugar a los demás procesos.

Uno de los aceptores de electrones alternativos más comunes en ambientes anóxicos es el nitrato (Madigan, et. al 2004), lo que permite que su reducción sea predominante sobre la reducción de quinonas, la sulfato reducción y la metanogénesis. Además, Coates, *et. al.* (1998), menciona que existe una diversidad de microorganismos en diferentes ambientes anaerobios capaces de llevar a cabo la desnitrificación.

La sulfato-reducción es un proceso respiratorio anaerobio donde el sulfato es usado como aceptor de electrones, pero tiene menor capacidad aceptora que  $\text{O}_2$  y  $\text{NO}_3^-$ . Muchas bacterias sulfato-reductoras son de origen marino (Madigan, et. al 2004), lo cual podría explicar por qué la reducción de sulfato superó a los procesos de reducción de AQDS y metanogénesis cuando se empleó el sedimento del manglar como inóculo.

Los bajos niveles de degradación puede ser atribuida al tipo de inóculo utilizado en éstos experimentos, en el caso de lodo granular anaerobio se sabe que tiene una alta actividad metanogénica, y muy probablemente poca cantidad de microorganismos reductores de quinonas y, en el caso de sedimento manglar no hay actividad metanogénica registrada y una insignificante respiración de microorganismos reductores de quinonas, sin embargo se sabe que las bacterias reductoras de nitrato y sulfato si están presentes en este inóculo, esto puede explicar

la poca actividad degradativa durante la degradación de estos compuestos fenólicos bajo estas condiciones.

Estos resultados tienen gran importancia en la biorremediación de sitios anaerobios contaminados con compuestos fenólicos. De hecho, los resultados sugieren que el humus, el cual es muy abundante en muchos sitios anaerobios y rico en moléculas de quinonas, puede contribuir a la capacidad de biorremediación de sitios contaminados con compuestos aromáticos sirviendo como aceptores finales de electrones. Estos resultados sugieren también que las quinonas juegan un papel muy importante en la biodegradación de material de plantas, los cuales contienen una variedad de sustancias fenólicas simples y complejas (Harborne 1980). Además, las quinonas en el humus pueden contribuir en importantes procesos del ciclo del carbono en la biosfera.

## CONCLUSIÓN

Los resultados presentados en este estudio indican que la presencia de quinonas, nitratos y sulfatos pueden contribuir en la oxidación de compuestos fenólicos sirviendo como aceptores finales de electrones. Los resultados sugieren que el humus puede ser un potencial aceptor final de electrones para la degradación de compuestos aromáticos en sitios anaerobios. Esta información necesita ser considerada en estudios futuros del flujo de electrones en suelos y sedimentos ya que tienen importantes implicaciones para la biotransformación de materia orgánica.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agencia para Sustancias tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). 1997. Reseña Toxicológica del Cloruro de Vinilo. Atlanta, GA. Departamento de Servicio de Salud Pública.
- Agencia para Sustancias tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). 1998. Reseña Toxicológica del Fenol. Atlanta, GA. Departamento de Servicio de Salud Pública.
- Anderson, R. T. and D. R. Lovley. (1999) Naphthalene and benzene degradation under Fe(III)-reducing conditions in petroleum-contaminated aquifers. *Bioremediation J.* 3, 121-135.
- Anderson, R. T. and D. R. Lovley. (2000). Anaerobic bioremediation of benzene under sulfate-reducing conditions in a petroleum-contaminated aquifer. *Environ. Sci. Technol.* 34, 2261-2266.
- Bak, F. & Widdel, F. (1986). Anaerobic degradation of phenol derivatives by *Desulfobacterium phenolicum* sp nov. *Arch. Microbiol.* 146: 177-180.
- Barkovskii, A. L. and P. Adriaens. (1998). Impact of humic constituents on microbial dechlorination of polychlorinated dioxins. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1013-1020.

- Benz, M., Schink, B. and Brune, A. (1998) Humic acid reduction by *Propionibacterium freudenreichii* and other fermentative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64,4507-4512.
- Berks, B., Richardson, D., Reilly, A., Aplin, R. and Ferguson, S. (1995) The *napEDABC* gene cluster encoding the periplasmic nitrate reductase from *Thiosphaera pantotropha*. *Biochem.* 220, 117-124.
- Boyd, S.A., Shelton, D.R., Berry, D. and Tiedje, J.M. (1993) Anaerobic degradation of phenolic compounds in digested sludges. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 50-54.
- Bruce, R.A., L.A. Achenbach and J.D. coates (1999). Reduction of perchlorate by a novel organism isolated from paper mill waste. *Environment Microbiology.* 1: 319-329.
- Cervantes-Carrillo, F. J. (2002). Quinones as electron acceptors and redox mediators for the anaerobic biotransformation of priority pollutants. Doctoral thesis. Wageningen University, Wageningen. The Netherlands.
- Cervantes, F.J., Vu-Thi-Thuy, L., Lettinga, G. and Field, J.A. (2004) Quinone-respiration improves dechlorination of carbon tetrachloride by anaerobic sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 702-711.
- Cervantes, F.J., De Bok F. A. M., Duong-Dac T., Stams, A. J. M., Lettinga G. and Field J. A. (2002) Reduction of humic substances by halo-respiring, sulphate-reducing and methanogenic microorganisms. *Environ. Microbiol.* 4, 51-57.
- Cervantes, F. J., Dijkstra, W., Duong-Dac, T., Ivanova, A., Lettinga, G. and Field, J. A. (2001a) Anaerobic mineralization of toluene by enriched sediments with quinones and humus as terminal electron acceptors. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4471-4478.

- Cervantes, F. J., Vu-Thi-Thuy, L., Lettinga, G. and Field, J. A. (2001b) The role of quinones on the reductive dechlorination of carbon tetrachloride by anaerobic granular sludge. Proceedings of the 9th World Congress on Anaerobic Digestion (A. F. M. Van Velsen and W. H. Verstraete, Eds.) Vol. 2, 231-233. Antwerpen, Belgium.
- 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.
- Cervantes, F. J., van der Velde, S., Lettinga, G. and Field, J. A. (2000a) Competition between methanogenesis and quinone respiration for ecologically important substrates in anaerobic consortia. *FEMS Microbiol. Ecol.* 34,161-171.
- Cervantes, F. J., van der Velde, S., Lettinga, G. and Field, J. A. (2000b) Quinones as terminal electron acceptors for anaerobic microbial oxidation of phenolic compounds. *Biodegradation* 11, 313-321.
- Coates, J. D., Ellis, D. J., Roden, E., Gaw, K., Blunt-Harris, E. L. and Lovley, D. R. (1998) Recovery of humics-reducing bacteria from a diversity of sedimentary environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64,1504-1509.
- Collins, R. and Picardal, F. (1999) Enhanced anaerobic transformation of carbon tetrachloride by soil organic matter. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2703-2710.
- Curtis, C. and Reinhard M. (1994) Reductive dehalogenation of hexachloroethane, carbon tetrachloride, and bromoform by anthrahydroquinone disulphonate and humic acid. *Environ. Sci. Technol.* 28, 2393-2401.

- Dwyer, D.F., Krumme, M.L., Boyd, S.A. and Tiedje J.M. (1986) Kinetics of phenol degradation by an immobilized methanogenic consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 345-351
- 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.
- Ferguson, S. (1994) Denitrification and its control. *A Van Leeuwenhoek*, 66, 89-110.
- Field, J. A. & Cervantes, F. J. (In press). Microbial redox reactions mediated by humus and structurally related quinones. In: *Use of Humic Substances to Remediate Polluted Environments: from Theory to Practice*. Perminova, I. & Hertkorn, N. Eds. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.
- Field, J. A., Cervantes, F. J., van der Zee, F. P. and Lettinga, G. (2000) Role of quinones in the biodegradation of priority pollutants: a review. *Water Sci. Technol.* 42, 215-222.
- Field, J.A. and Cervantes, F.J. (In Press) Microbial redox reactions mediated by humus and structurally related quinones. In: *Use of humics substances to remediate polluted environments: from theory to practice* . Perminova I. And Hertkorn, N. Eds. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Field, J.A., Stams, A.J.M., Kato, M. and Schraa, G. (1995) Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. *Antonie van Leeuwenhoek*. 67: 47-77
- Finneran, K. T. and Lovley D. R. (2001) Anaerobic degradation of methyl tert-butyl ether (MTBE) and tert-butyl alcohol (TBA). *Environ. Sci. Technol.* 35, 1785-1790.

- Francis, C. A., Obratsova, A. Y. and Tebo, B. M. (2000) Dissimilatory metal reduction by the facultative anaerobe *Pantoea agglomerans* SP1. *Appl. Environ. Microbiol.* 66,543-548.
- Fredrickson, J. K., Kostandarites, 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.
- Halling-Sorensen, B. (1993) Process chemistry and biochemistry of nitrification. In; The removal of nitrogen compounds from wastewater. Halling-Sorensen, B. and Jorgensen, S. Eds. Elsevier, Netherlands. pp. 119-152.
- Harborne, J.B., (1980) Plant phenolics. In: Bell & Charlwood BV (Eds) Secondary plants products (pp. 329-402). Springer-Verlag, New York
- Hill, G. & Robinson, C. W. (1975) Review: Anaerobic metabolism of degradation by *Pseudomonas putida*. *Biotechnol. Bioeng.*17: 1599-1615.
- Hutchins, S. R., Sewell G. W., Kovacs D. A. and Smith G. A. (1991) Biodegradation of aromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms under denitrifying conditions. *Environ. Sci. Technol.* 25, 68-76.
- Jetten, M., Logemann, S., Muyzer, G., Robertson, L., De Vries, S., Van Loosdrecht, M. and Kuenen, J. (1997) Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *A. Van Leeuwenhoek*, 71, 75-93.
- Knowles, R. (1982). Denitrification. *Microbiol. Rev.*46, 43-70.
- 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. & Lonergan D. J. (1990). Anaerobic oxidation of toluene, phenol and *p*-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism, GS-15. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1858-1864.

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.

Madigan, Michael T., Martinko, John M., Parker, Jack. (2004) *Brock Biología de los microorganismos*, decima edición, Editorial Prentice Hall, España.

Mateju, V., Cizinska, S., Krejčí, J. And Janoch, T. (1992) Biological water denitrification- A-review. *Enzyme Microbiol. Technol.* 14, 170-183.

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.

Scott, D. T., McKnight, D. M., Blunt-Harris, E. L., Kolesar, S. E. and Lovley, D. R. (1998) Quinone moieties act as electron acceptors in the reduction of humic

substances by humics-reducing microorganisms. *Environ. Sci. Technol.* 32,2984-2989.

Slobodkin, A. I., Tourova, T. P., Kuznetsov, B. B., Kostrikina, N. A., Chernyh, N. A., and Bonch-Osmolovskaya, E. A. (1999) *Thermoanaerobacter siderophilus* sp. nov., a novel dissimilatory Fe(III)-reducing, anaerobic, thermophilic bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1471-1478.

Solomon, G. (1982). *Química Orgánica*. Ed. Limusa. Segunda Reimpresión. México. Pp. 1125.

Stevenson, F. J. (1994) *Humus chemistry: genesis, Composition, Reactions*, 2nd ed. Wiley, New York.

Stouthamer, A., (1976) Biochemistry and genetics of nitrate reductase in bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.* 14, 315-375.

Tawfiki, K.H., Lépine, F. Bisailon, J.G., Beaudet, R., Hawari, J. and Guiot, S.R. (2000) Effects of bioaugmentation strategies in UASB reactors with a methanogenic consortium for removal of phenolic compounds. *Biotechnol. Bioeng.* 67: 417-423

Tschech, A. & Fuchs, G. (1987). Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying pseudomonads. *Arch. Microbiol.* 148: 213-217.

Vallero, M.V.G., Sipma J., Annachatre A., Lens P.N.L. and Hulshoff Pol L.W. (2003). Biotechnological treatment of sulfur-containing wastwwaters. In: Fingerman M. And Nagabhushanam R. (eds). *Recent advances in marine biotechnology*. Vol 8 bioremediation. Science Publishers, Enfiel (NH), USA. Pp.233-268.

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.

Villanueva, Ortiz (1987). *Edafología*. Sexta edición. Chapingo, México. Pp 331.

Wang, Y. T., Suidan, M. T. & Ritman B. E. (1986). Anaerobic treatment of phenol by an expanded-bed reactor. *J. WPCF.* 58: 227-233.

Wild, Alan (1993). *Soils and the environment: an introduction*. Ed. Cambridge. Primera edición. Pp. 287.