



# ITSON

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIAS ALIMENTARIAS

TESIS:  
**“COMPETENCIA ENTRE DIFERENTES GRUPOS  
MICROBIANOS POR SUSTRATOS ECOLÓGICAMENTE  
IMPORTANTES”**

TITULACIÓN POR TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**INGENIERO BIOTECNÓLOGO**

PRESENTA:

**URIEL BELTRÁN PÉREZ**

**ASESOR: DR. FRANCISCO CERVANTES CARRILLO**

**CD. OBREGÓN SONORA, AGOSTO 2006**

## **RESUMEN**

La presente investigación tiene como objetivo determinar la competencia entre bacterias reductoras del humus, sulfato y productoras de metano; mediante la cuantificación de compuestos consumidos y generados durante la oxidación anaerobia de lactato, propionato y acetato para determinar bajo que condiciones el inoculo que se utilizara, trabaja de manera mas eficiente.

Se exploró un lodo granular procedente de una industria papelera ubicada en Eerbeek Holanda. Este lodo se expuso a diferentes sustratos que son considerados ecológicamente importantes (ácido láctico, ácido propionico y ácido acético) así como también a diferentes concentración de sulfato y de quinonas; estos últimos jugando el papel de receptores de electrones.

Cada experimento con sus variantes las cuales consisten en variar el tipo de sustratos y la concentración de sulfatos y quinonas (AQDS), se mantubieron en incubación a 30°C y se toman muestras cada determinado periodo de tiempo para determinar la reducción de quinonas, lo cual se midió bajo condiciones anaerobias (cámara anaerobia) por un método colorimétrico, utilizando un espectrofotómetro marca Génesis 20 Thermospectronics a una longitud de onda de 450 nm. La cámara anaerobia es marca COY modelo 14500 y para propiciar condiciones anaeróbicas en la misma, se usó una atmósfera formada por N<sub>2</sub> /H<sub>2</sub> (95/5). Se incluyó un catalizador de paladio para asegurar la ausencia de oxígeno. Para llevar acabo las lecturas con mayor precisión, las muestras fueron diluidas al 50% con una solución buffer de bicarbonato de sodio. La reducción de sulfatos Las concentraciones de sulfato fueron determinadas mediante Cromatografía Liquida 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 6500 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<sup>TM</sup>; y un detector de conductividad, del mismo fabricante, modelo 432. El eluente que se

empleó fue un buffer de borato/gluconato de sodio, para ello se preparó un solución concentrada de borato/gluconato de sodio, descrita en el manual del equipo. Posteriormente se preparó una segunda solución: 20 ml solución concentrada borato/gluconato de sodio, 20 ml de n-butanol y 120 ml de acetonitrilo y se aforó a 1000 ml con agua desionizada, y se procedió a filtrar al vacío con papel Watman #1, finalmente se sonificó 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, así como la producción de metano. La producción de metano fue medida por cromatografía de gases, por el método establecido para la determinación de biogás, en un equipo marca VARIAN 3800. Se obtuvo la concentración de metano en cada muestra que se inyectó, calculando el área bajo la curva. El cromatógrafo cuenta con un detector de ionización de flama (FID) y una columna Porapak Q con una malla 80/100. Las temperaturas de operación de la columna, el inyector y el detector fueron de 35, 170 y 190°C respectivamente.

El muestreo se detuvo cuando las lecturas dejen de presentar cambios significativos entre una muestra y otra, lo que indica que el sustrato ha sido consumido por completo.

De acuerdo con lo obtenido en la investigación se concluyó que las bacterias reductoras de quinonas son las más competitivas, seguidas por las bacterias productoras de metano y estas a su vez por las bacterias sulfato - reductoras en el inóculo estudiado. Por otra parte, la presencia de bacterias sulfato – reductoras y bacterias productoras de metano, no afectan de manera significativa las bacterias reductoras de humus.

## ÍNDICE GENERAL

	PÁG
I.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Justificación.....	2
1.3 Planteamiento del Problema.....	3
1.4 Hipótesis.....	4
1.5 Objetivo.....	4
II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Generalidades del humus.....	5
2.2. Funciones del humus.....	6
2.2.1 Como aceptor final de electrones.....	6
2.2.2 Como mediador redox.....	7
2.2.3 Como donador de electrones.....	10
2.2.4 Aplicación del humus a sitios contaminados.....	12
2.2.4.1 Ventajas de utilizar humus en biorremediaciones.....	12
2.3 Microorganismos reductores del humus.....	13
2.4 Metanogénesis.....	15
2.5 Sulfato -reducción.....	17
III.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1 Ubicación del Experimento.....	18
3.2 Inóculo.....	18
3.3 Medio Basal.....	19
3.4 Diseño del Experimento.....	19
3.5 Método Analítico.....	20
IV.- RESULTADOS.....	22
V.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	41
VI.- CONCLUSIONES.....	43
VII.- BIBLIOGRAFÍA.....	44

## ÍNDICE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS	DESCRIPCION	PÁG.
1	Diversidad filogenética de microorganismos reductores del humus y/o AQDS.....	13-14
2	Tratamientos utilizados para los experimentos (cada tratamiento se llevo acabo por triplicado).....	19
FIGURAS		PÁG.
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.....	7
2	Mecanismo de reducción de colorantes azo a través del compuesto modelo AQDS (2,6-disulfonato de antraquinona). ....	8
3	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.....	11
4	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> (Madigan et. al., 2004).....	15
5	Reducción de AQDS y producción de metano por el lodo anaerobio utilizando ácido láctico como sustrato en ausencia de sulfato.....	23
6	Competencia entre la reducción de sulfato (1 mM), AQDS (2 mM) y la producción de metano en el lodo anaerobio con lactato como donador de electrones.....	23
7	Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (2 mM) y la producción de metano en el lodo anaerobio con lactato como donador de electrones.....	24
8	Competencia entre la reducción de sulfato (4 mM), AQDS (2 mM) y la producción de metano en el lodo anaerobio con lactato como donador de electrones.....	24
9	Competencia entre la reducción de sulfato (6 mM), AQDS (2 mM) y la producción de metano en el lodo anaerobio con lactato como donador de electrones.....	25
10	Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM) y la producción de metano en lodo anaerobio con lactato como donador de electrones.....	25
11	Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (2 mM) y la producción de metano en el lodo anaerobio con lactato como donador de electrones.....	26
12	Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (4 mM) y la producción de metano en el lodo anaerobio con lactato como donador de electrones.....	27
13	Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (6 mM) y la producción de metano en el lodo anaerobio con lactato como donador de electrones.....	27

14	Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (8 mM) y la producción de metano en el lodo anaerobio con lactato como donador de electrones.....	28
15	Reducción de AQDS y producción de metano por el lodo anaerobio utilizando ácido propionico como sustrato en ausencia de sulfato.....	29
16	Competencia entre la reducción de sulfato (1 mM), AQDS (2 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con propionato como donador de electrones.....	29
17	Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (2 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con propionato como donador de electrones.....	30
18	Competencia entre la reducción de sulfato (4 mM), AQDS (2 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con propionato como donador de electrones.....	30
19	Competencia entre la reducción de sulfato (6 mM), AQDS (2 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con propionato como donador de electrones.....	31
20	Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (0 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con propionato como donador de electrones.....	32
21	Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (2 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con propionato como donador de electrones.....	33
22	Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (4 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con propionato como donador de electrones.....	33
23	Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (6 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con propionato como donador de electrones.....	34
24	Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (8 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con propionato como donador de electrones.....	34
25	Reducción de AQDS y producción de metano por el lodo anaerobio utilizando ácido acético como sustrato en ausencia de sulfato.....	35
26	Competencia entre la reducción de sulfato (1 mM), AQDS (2 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con acetato como donador de electrones.....	35
27	Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (2 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con acetato como donador de electrones.....	36
28	Competencia entre la reducción de sulfato (4 mM), AQDS (2 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con acetato como donador de electrones.....	37
29	Competencia entre la reducción de sulfato (6 mM), AQDS (2 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con acetato como donador de electrones.....	38
30	Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), y producción de metano en el lodo anaerobio con acetato como donador de electrones, en ausencia de AQDS.....	38
31	Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (2 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con acetato como donador de electrones.....	39

32	Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (4 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con acetato como donador de electrones.....	39
33	Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (6 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con acetato como donador de electrones.....	40
34	Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (8 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con acetato como donador de electrones.....	40

# I.- INTRODUCCIÓN

## 1.1 ANTECEDENTES

El humus es la materia orgánica que se acumula en el suelo y en los sedimentos acuáticos, 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 estas propiedades catalíticas (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 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, ya que presenta las siguientes ventajas respecto a otras técnicas: 1) es muy abundante y su obtención no representa una inversión mayor; 2) 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), 3) mayor solubilidad en el agua respecto a otros aceptores de electrones alternos ( $O_2$ , Fe(III) y Mn(IV)), 4) propiedades para absorber metales pesados y compuestos orgánicos, lo cual permite una mejor disponibilidad de los mismos para ser transformados por los microorganismos responsables (Field *et al.* 2000). 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

Recientemente se ha descubierto que la sustancia compuesta por productos orgánicos, de naturaleza coloidal, que proviene de la descomposición de los restos orgánicos también conocida como *Humus*, juega un papel muy importante la degradación anaerobia de compuestos sencillos y complejos. El humus puede participar en dicha degradación como donador de electrones, como aceptor de electrones y/o como mediador en las reacciones de oxidación-reducción. En un sistema natural, se encuentre una gran 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 pudieran provocar las bacterias sulfato-reductoras al estar presentes en un sistema que se trata de restaurar mediante la ayuda del humus. Por dicho motivo surge el interés por investigar la capacidad catalítica del humus en presencia de aceptores de electrones alternos como sulfato, durante la oxidación anaerobia de sustratos ecológicamente importantes como acetato, propionato y lactato.

Al poder determinar el efecto que tiene la presencia de aceptores de electrones alternos en un consorcio anaerobio, conteniendo bacterias que compiten por los sustratos disponibles, nos facilitara la comprensión del papel que el humus realiza en este tipo de ambientes. Los resultados que arrojen estos experimentos, nos darán la pauta para poder desarrollar sistemas donde se pueda predecir el comportamiento fisiológico de las bacterias reductoras del humus en presencia de contaminantes como podría ser el benceno.

### **1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Se ha observado que el humus presenta propiedades potenciales en la biodegradación anaerobia de compuestos simples y recalcitrantes. En un ambiente anaerobio natural, pueden coexistir 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 reductoras del humus 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 las rutas tróficas (Ej. acetato, lactato).

El presente trabajo aportará datos inéditos que ayudarán a predecir el papel catalítico del humus en la degradación anaerobia de compuestos orgánicos, en presencia de otros aceptores de electrones (sulfato).

## **1.4 HIPÓTESIS**

Las bacterias reductoras del humus presentan mejor acción competitiva por acetato y lactato que las bacterias sulfato-reductoras y estas a su vez que las productoras de metano.

## **1.5 OBJETIVO**

Determinar la competencia entre bacterias reductoras del humus, sulfato y productoras de metano; mediante la cuantificación de compuestos consumidos y generados durante la oxidación anaerobia de lactato, propionato y acetato.

## **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), La composición química del humus está formada por: huminas (fracción mineral), ácidos húmicos (con alto contenido en quinonas), ácidos fúlvicos, y ácidos hematomelánicos. Además de estos compuestos, están presentes sustancias orgánicas en diversos estados de descomposición; aminas, productos orgánicos de degradación de hongos y bacterias; proteínas y sus productos de degradación, péptidos y aminoácidos; taninos y sus productos de

degradación, polifenoles y fenoles; ácidos orgánicos diversos; enzimas; fitohormonas; clorofila, carotenos y derivados.

## 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).

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

Lovley, *et al.* (1996) 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, Figura 1).

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, glucosa, hidrógeno, propionato, piruvato, entre otros.

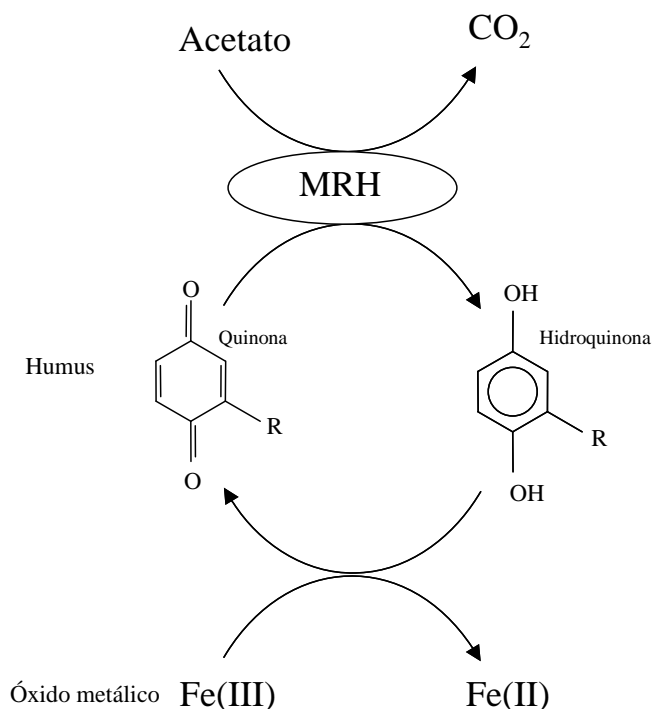


Figura 1. Oxidación de acetato por microorganismos reductores del humus (MRH) acoplado a la reducción de óxidos férricos en la que participan las quinonas como transportadores de electrones. (Fuente Coates *et al.*, 1998)

### 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

2). 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).

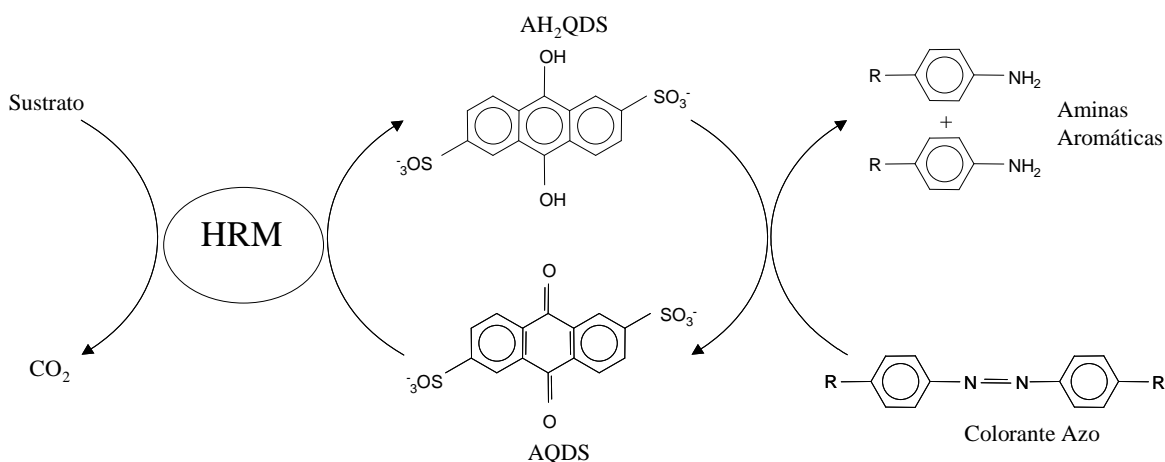


Figura 2. Mecanismo de reducción de colorantes azo a través del compuesto modelo AQDS (2,6-disulfonato de antraquinona). (Field *et al.*, 2000).

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 ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) o la vernadita ( $\text{MnO}_2$ ), 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 (HCA) 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*, 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.*, 1990; 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 o al compuesto análogo reducido 2,6 disulfonato de antrahidroquinona (AHQDS), usando nitrato o fumarato como aceptor de

electrones (Figura 3). Los microorganismos involucrados en este proceso son: *Geobacter metallireducens*, *Geobacter sulphurreducens*, *Geothrix fermentans*, *Shewanella alga* y *Wollinella succinogenes*. (Lovley, et.al. 1999).

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).

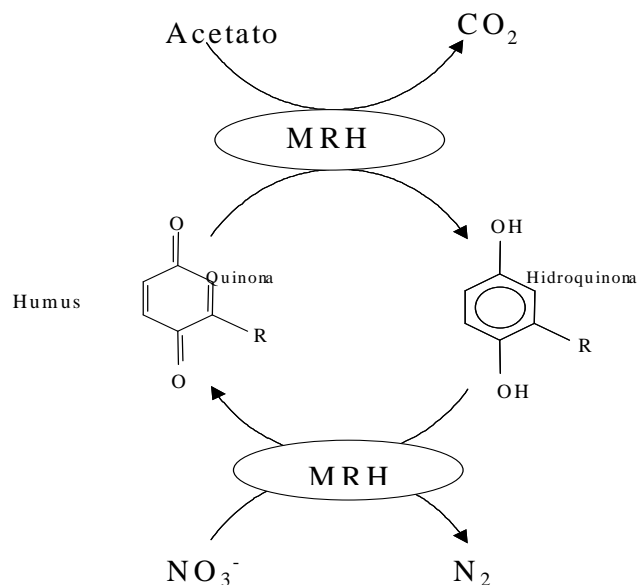


Figura 3. Oxidación de acetato por microorganismos reductores del humus (MRH) acoplado a la bio-reducción del nitrato en la que participan las hidroquinonas como donadores de electrones. (Bruce et al., 1999).

### 2.2.4 Aplicación del humus a 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).

#### 2.2.4.1 Ventajas de utilizar el humus en biorremediación

- El 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).

## 2.3 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.*, 1996), 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 *Desulfotobacterium 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, 2005)

Filogenia	Microorganismo	Aceptor electrónico*
<b>Archea</b>		
<i>Metanococcales</i>	<i>Methanococcus thermolithotrophicus</i>	AQDS
	<i>Methanococcus voltaei</i>	AQDS
<i>Methanobacterales</i>	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	AQDS
	<i>Methanobacterium palustre</i>	AQDS Y HA
<i>Methanosarcinales</i>	<i>Methanosarcina barkeri</i>	AQDS Y HA
	<i>Methanolobus 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
$\alpha$ - Proteobacteria	<i>Sphingomonas xenophaga</i> BN6	AQS
$\beta$ - Proteobacteria	<i>Ralstonia eutropha</i> 335	AQS
$\delta$ - Proteobacteria	<i>Geobacter metallireducens</i>	AQDS Y HA
	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	AQDS Y HA
	<i>Geobacter humireducens</i>	AQDS Y HA
	<i>Geobacter</i> JW-3	AQDS Y HA
	<i>Geobacter</i> TC-4	AQDS Y HA
	<i>Geobacter grbiciae</i>	AQDS
	<i>Desulfovibrio</i> G11	AQDS
	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	DMBQ, NQ
	<i>Desulfuromonas acetexigens</i>	AQDS
	<i>Desulfuromonas</i> SDB-1	AQDS
	<i>Desulfuromonas</i> FD-1	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</i> PCE1	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.

## 2.4 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).

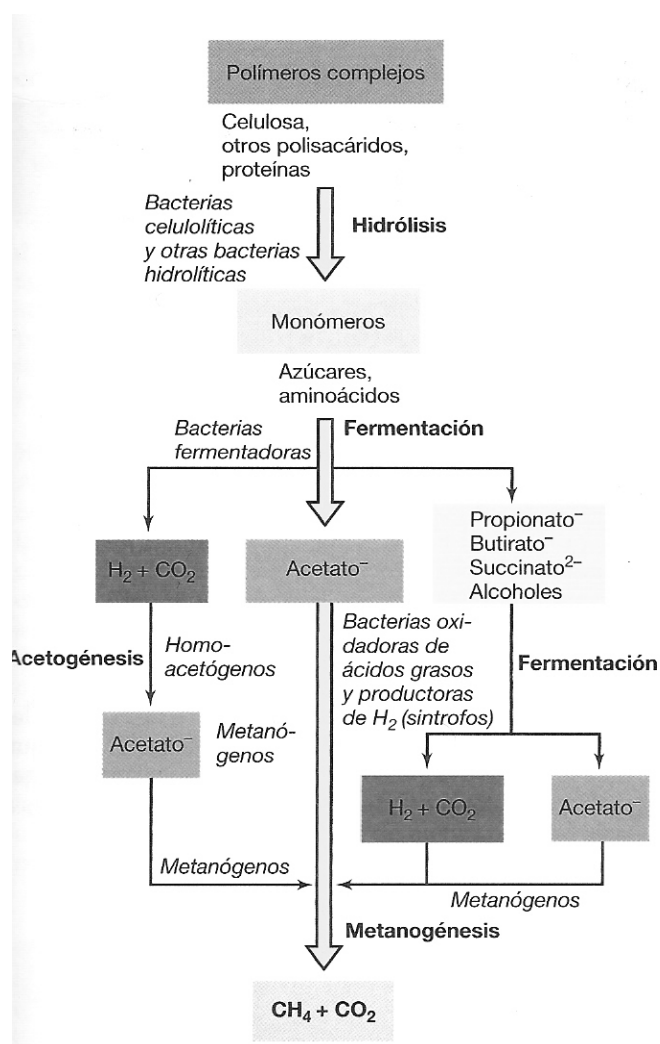


Figura 4. Proceso global de la descomposición anóxica, mostrando la forma en que varios grupos fermentativos actúan en la conversión de materiales orgánicos complejos a  $CH_4$  y  $CO_2$  (Madigan et. al., 2004).

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  $C_1$  (molécula de dióxido de carbono que se introduce al ciclo) desde el sustrato inicial,  $CO_2$ , hasta el producto final, metano; y las enzimas que en la reacción rédox suministran los electrones necesarios para la reducción de  $CO_2$  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 4 se muestra cómo también los organismos sintróficos 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 microorganismos fermentativos no pueden competir por los ácidos grasos/alcoholes con las bacterias sulfato reductoras.

## 2.5 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  $SH_2$ . 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 1998).

La sulfato-reducción es un proceso respiratorio anaerobio donde el sulfato es usado como aceptor de electrones. 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).



## **III.- MATERIALES Y METODOS**

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

Los experimentos se llevarón a cabo en los laboratorios de ecodesarrollo y análisis especiales del ITSON, en el periodo de Junio del 2005 a Junio del 2006.

### **3.2 Inóculos**

Se exploró un lodo granular procedente de una industria papelera ubicada en Eerbeek Holanda. Durante su almacenamiento, el lodo se mantuvo en refrigeración totalmente hidratado. Para utilizar este inóculo, sólo se necesitó tomar la cantidad de gránulos necesarios procurando que estos estuvieran expuestos al aire el menor tiempo posible.

### 3.3 Medio basal.

El medio basal que se utilizó durante los experimentos contenía (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<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (0.012), CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (0.005); Na<sub>2</sub>S (0.013); 1 ml/L de elementos traza y vitaminas.

### 3.4 Diseño experimental.

El experimento constó de 10 tratamientos (Tabla 2). Las constantes en todos los casos fueron el inóculo (0.7518 gr/l en peso seco) y la concentración de contaminante (ácido láctico, ácido propionico o ácido acético)

Tabla 2. Tratamientos utilizados para los experimentos (cada tratamiento se llevo acabo por triplicado)

Muestra	AQDS	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>
1	2mM	0mM
2	2mM	1mM
3	2mM	2mM
4	2mM	4mM
5	2mM	6mM
6	0mM	2mM
7	2mM	2mM
8	4mM	2mM
9	6mM	2mM
10	8mM	2mM

Para todos los experimentos, se usaron botellas serológicas de vidrio de 120 ml, las cuales se inocularon con lodo anaerobio granular (0.7518 g/l en peso seco), en medio basal con su respectivo aceptor de electrones (sulfato o AQDS) y el sustrato correspondiente (ácido láctico, ácido propionico o ácido acético). 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 con sellos de aluminio. Las botellas fueron sometidas a una corriente de  $N_2/CO_2$  (80%/20%) por 5 minutos, con el propósito de establecer condiciones anaerobias en las mismas.

El motivo de llevar a cabo el experimento por triplicado es con el fin de verificar la reproducibilidad de los resultados. Se tomaron muestras 2 veces por día durante los primeros 2 días de incubación para determinar la concentración de AQDS y sulfato y una vez por día se midió la concentración de metano. Del tercer día en adelante, se muestreó una vez cada segundo día para dar seguimiento al experimento.

### **3.5 Métodos analíticos.**

- La reducción de AQDS se midió bajo condiciones anaerobias (cámara anaerobia) por un método colorimétrico, utilizando un espectrofotómetro marca Génesis 20 Thermospectronics a una longitud de onda de 450 nm. La cámara anaerobia es marca COY modelo 14500 y para propiciar condiciones anaeróbicas en la misma, se usó una atmósfera formada por  $N_2/H_2$  (95/5). Se incluyó un catalizador de paladio para asegurar la ausencia de oxígeno. Para llevar a cabo las lecturas con mayor precisión, las muestras fueron diluidas al 50% con una solución buffer de bicarbonato de sodio.
- Las concentraciones de sulfato fueron determinadas 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 6500 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 un buffer de borato/gluconato de sodio, para ello se preparó un solución concentrada de borato/gluconato de sodio, descrita en el manual del equipo. Posteriormente se preparó una segunda solución: 20 ml solución concentrada borato/gluconato de sodio, 20 ml de n-butanol y 120 ml de acetonitrilo y se aforó a 1000 ml con agua desionizada, y se procedió a filtrar al vacío con papel Watman #1, finalmente se sonificó 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, en un equipo marca VARIAN 3800. Se obtuvo la concentración de metano en cada muestra que se inyectó, calculando el área bajo la curva. El cromatógrafo cuenta con un detector de ionización de flama (FID) y una columna Porapak Q con una malla 80/100. Las temperaturas de operación de la columna, el inyector y el detector fueron de 35, 170 y 190°C respectivamente.

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

## IV.- RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos en los 10 diferentes experimentos para oxidar los 3 sustratos estudiados (ácido láctico, propionico y acético), los cuales son ecológicamente importantes por su gran abundancia en distintos ambientes anaerobios, en presencia de sulfato y AQDS como aceptores finales de electrones.

### **Experimentos con concentración de AQDS constante y concentración de sulfato variable utilizando ácido láctico como sustrato**

En la Figura 5 se muestra la reducción de AQDS (2 mM), utilizando ácido láctico como fuente de energía, en ausencia de sulfato. Como se puede observar, la

reducción de AQDS ocurrió de manera constante hasta lograr su reducción casi completa después de 5 días de incubación. La producción de metano fue nula.

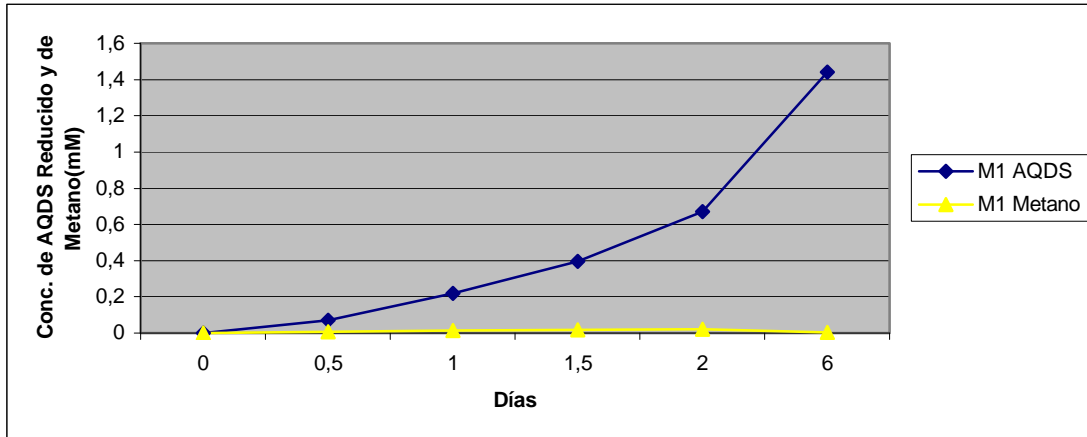


Figura 5. Reducción de AQDS y producción de metano por el lodo anaerobio utilizando ácido láctico como sustrato en ausencia de sulfato.

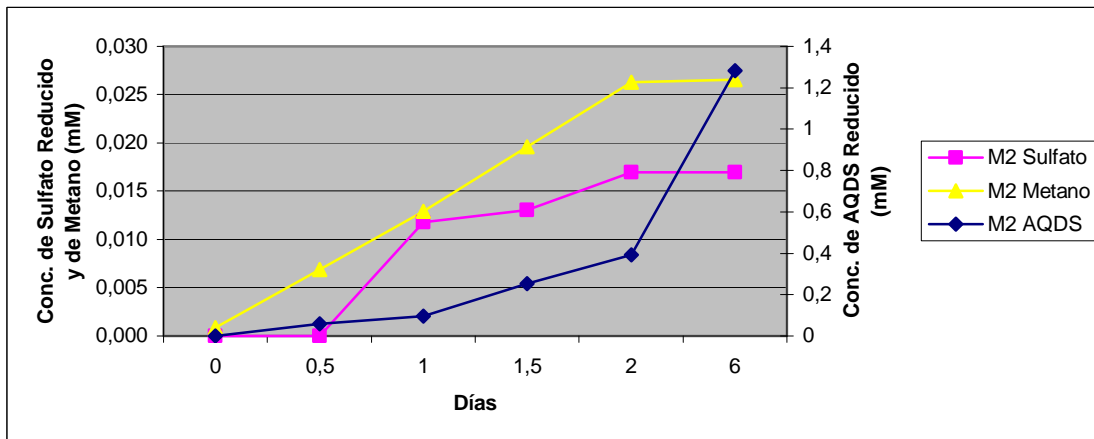


Figura 6. Competencia entre la reducción de sulfato (1 mM), AQDS (2 mM) y la producción de metano en el lodo anaerobio con lactato como donador de electrones.

En la Figura 6 se muestran los resultados obtenidos de la incubación del lodo en presencia de sulfato (1 mM) y AQDS (2 mM). Como se puede observar, ambos procesos respiratorios ocurrieron de manera paralela; sin embargo, la reducción de AQDS prevaleció sobre la reducción de sulfato, ya que este último proceso

ocurrió a una velocidad mucho menor. En cuanto a la producción de metano, es más lenta que la reducción de AQDS pero es más veloz que la sulfato – reducción.

La reducción de AQDS prevaleció sobre el proceso de sulfato-reducción y ésta a su vez, sobre la producción de metano, aún cuando la concentración de sulfato se aumentó en el medio a 2, 4 y 6 mM como se puede observar en las Figuras 7, 8 y 9. Además, la velocidad de reducción de AQDS no se afectó por el aumento en la concentración de sulfato en el medio.

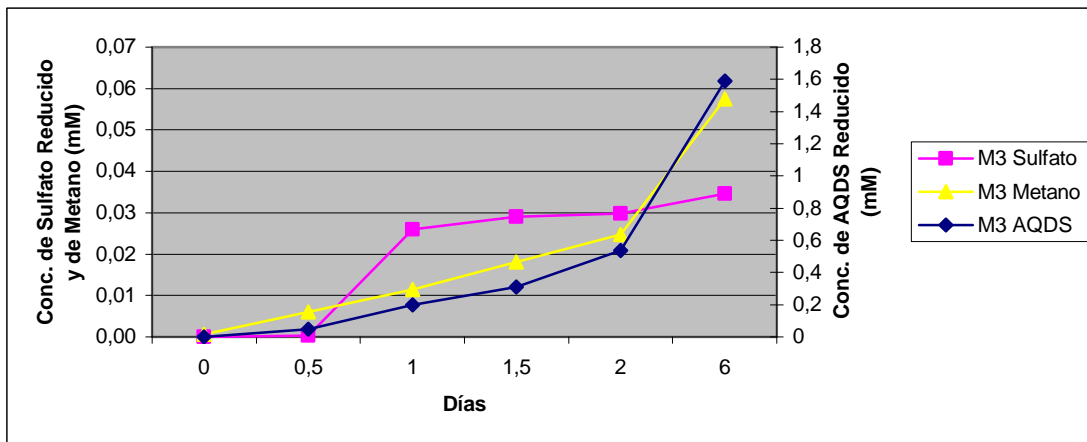


Figura 7. Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (2 mM) y la producción de metano en el lodo anaerobio con lactato como donador de electrones.

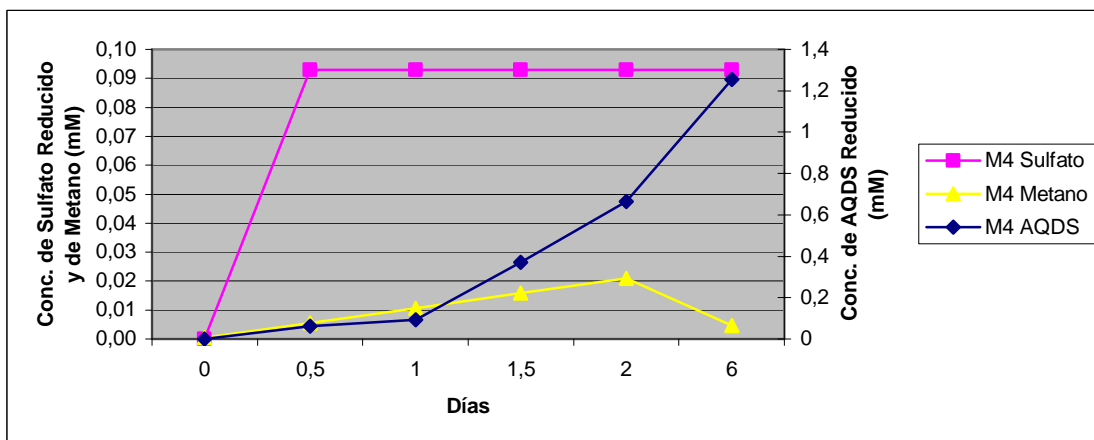


Figura 8. Competencia entre la reducción de sulfato (4 mM), AQDS (2 mM) y la producción de metano en el lodo anaerobio con lactato como donador de electrones.

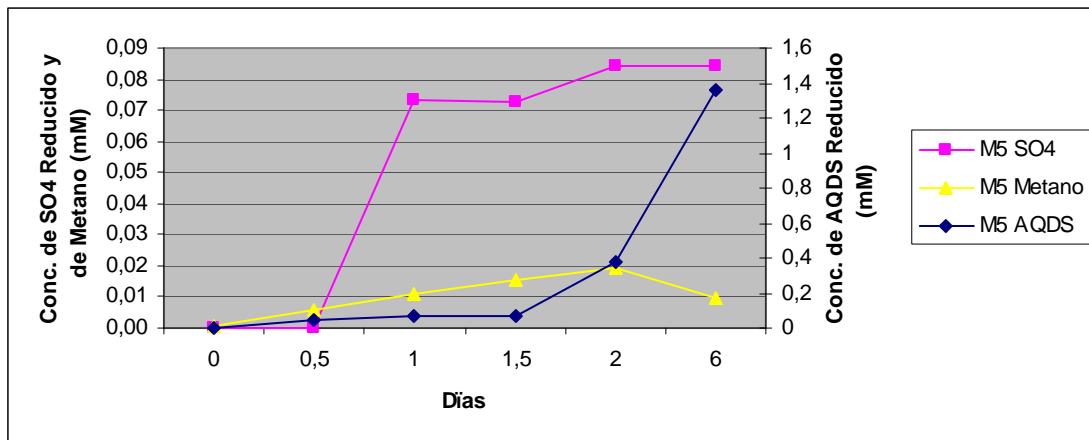


Figura 9. Competencia entre la reducción de sulfato (6 mM), AQDS (2 mM) y la producción de metano en el lodo anaerobio con lactato como donador de electrones.

### Experimentos con concentración de AQDS variable y concentración de sulfato constante utilizando ácido láctico como sustrato

En ausencia de AQDS, el lodo anaerobio presentó una baja velocidad de reducción de sulfato y alcanzó su más alta producción de metano, como puede observarse en la Figura 10. Únicamente se obtuvo una concentración de sulfato reducido de 40  $\mu\text{M}$  después de 5 días de incubación.

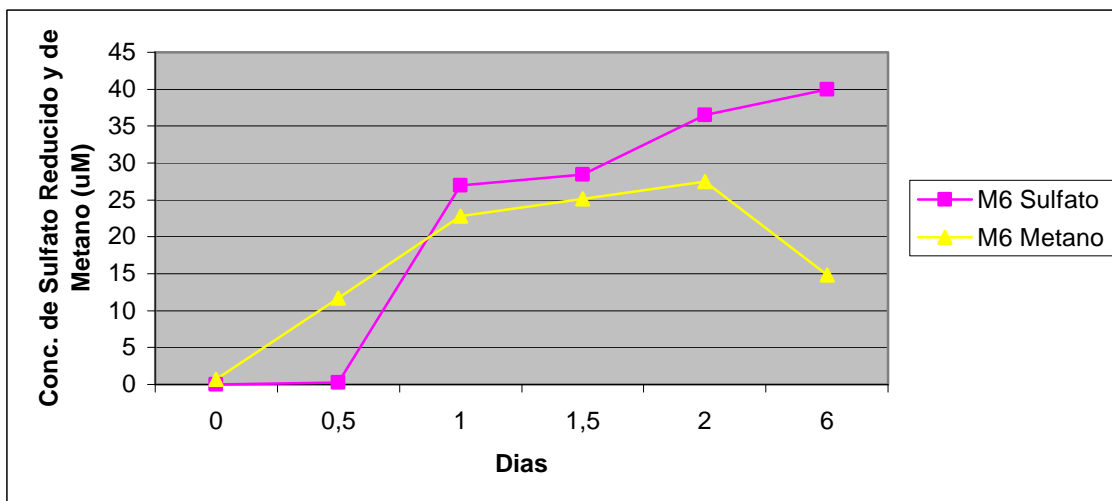




Figura 10. Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM) y la producción de metano en lodo anaerobio con lactato como donador de electrones.

El incremento en la concentración de AQDS en el medio propició que la velocidad de reducción de sulfato disminuyera aún más. Por otra parte, al incrementar la concentración de AQDS en el medio, se observó una mayor velocidad de reducción de este aceptor de electrones. En cuanto a la producción de metano, ésta es muy limitada (Figuras 11, 12, 13 y 14).

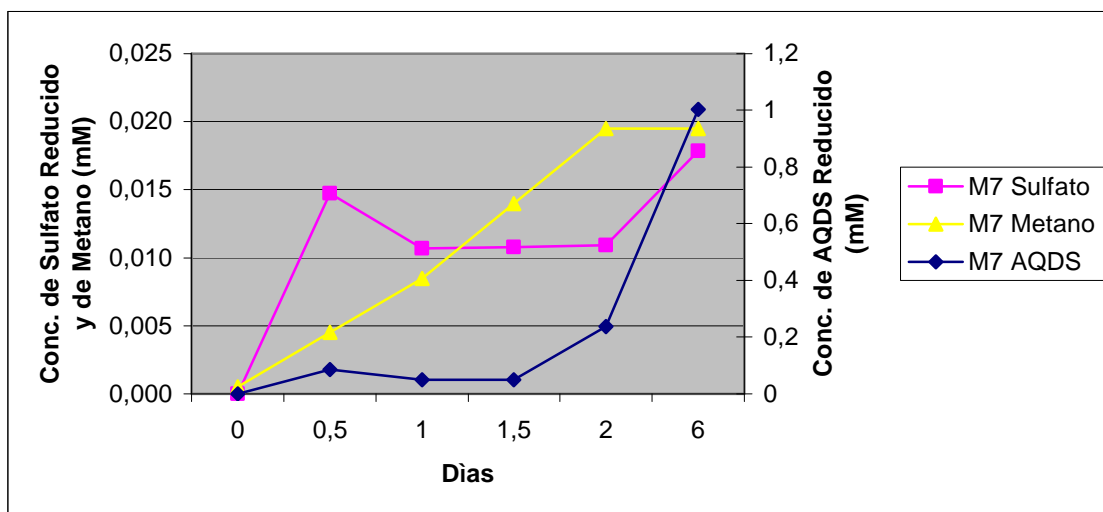


Figura 11. Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (2 mM) y la producción de metano en el lodo anaerobio con lactato como donador de electrones.

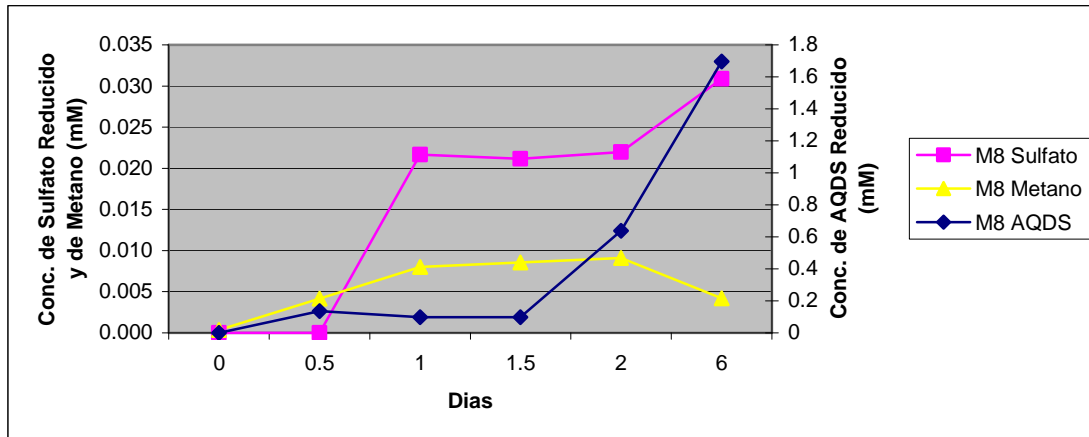


Figura 12. Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (4 mM) y la producción de metano en el lodo anaerobio con lactato como donador de electrones.

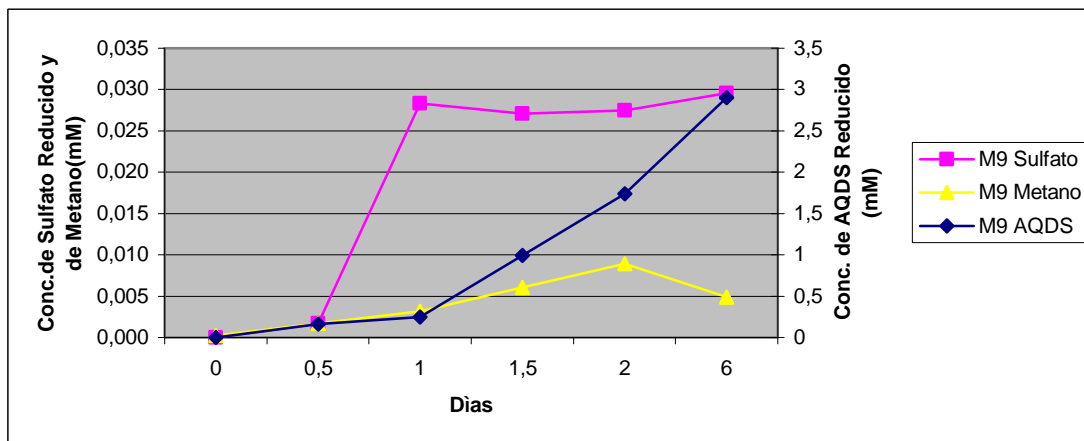


Figura 13. Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (6 mM) y la producción de metano en el lodo anaerobio con lactato como donador de electrones.

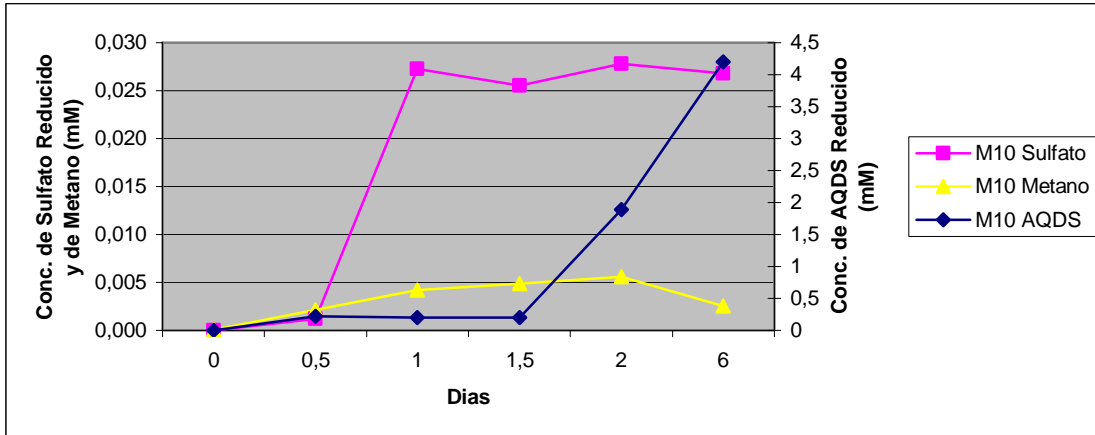


Figura 14. Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (8 mM) y la producción de metano en el lodo anaerobio con lactato como donador de electrones.

### Experimentos con concentración de AQDS constante y concentración de sulfato variable utilizando ácido propiónico como sustrato

En la Figura 15 se muestra la reducción de AQDS (2 mM), utilizando ácido propiónico como fuente de energía, en ausencia de sulfato. Como se puede observar, la reducción de AQDS ocurrió de manera constante hasta lograr su reducción casi completa después de 18 días de incubación. Por otro lado, el metano inicia a producirse desde el inicio de la incubación; sin embargo, después del día 1 la producción es mínima.

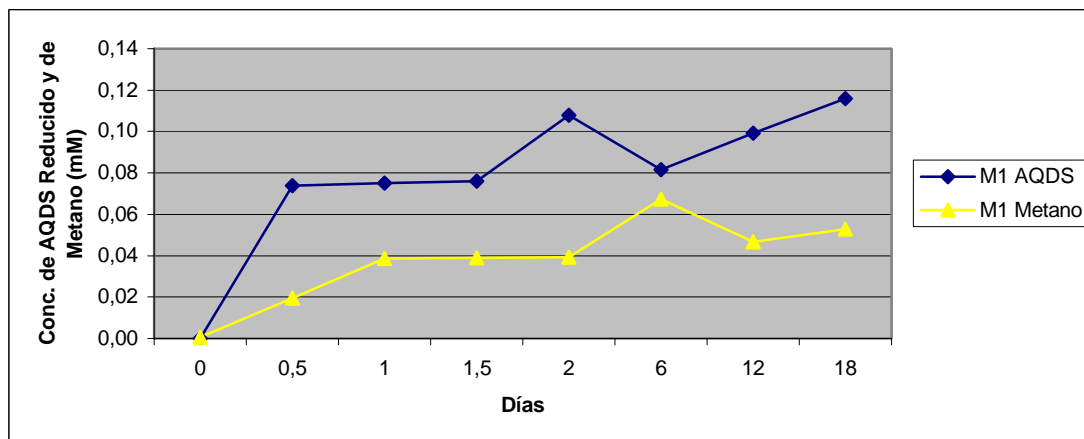


Figura 15. Reducción de AQDS y producción de metano por el lodo anaerobio utilizando ácido propionico como sustrato en ausencia de sulfato.

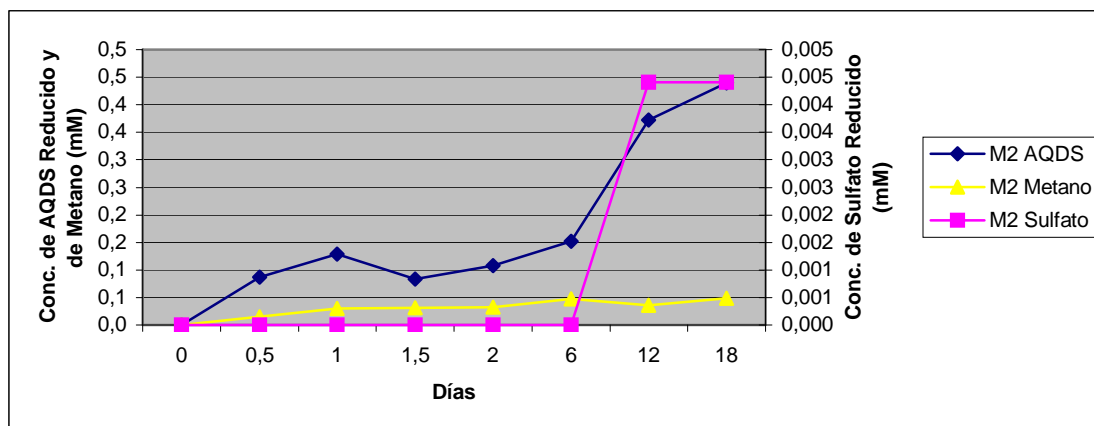


Figura 16. Competencia entre la reducción de sulfato (1 mM), AQDS (2 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con propionato como donador de electrones.

En la Figura 16 se muestran los resultados obtenidos de la incubación del lodo en presencia de sulfato (1 mM) y AQDS (2 mM). Como se puede observar, ambos procesos respiratorios ocurrieron de manera paralela; sin embargo, la reducción de AQDS prevaleció sobre la reducción de sulfato, ya que este último proceso ocurrió a una velocidad mucho menor.

La reducción de AQDS prevaleció sobre el proceso de sulfato-reducción, aún cuando la concentración de sulfato se aumentó en el medio a 2, 4 y 6 mM como se

puede observar en las Figuras 17, 18 y 19. Además, la velocidad de reducción de AQDS se afectó por el aumento en la concentración de sulfato en el medio de manera mínima. Por otro lado, la producción de metano fue más lenta que la reducción de AQDS y más rápida que la sulfato – reducción.

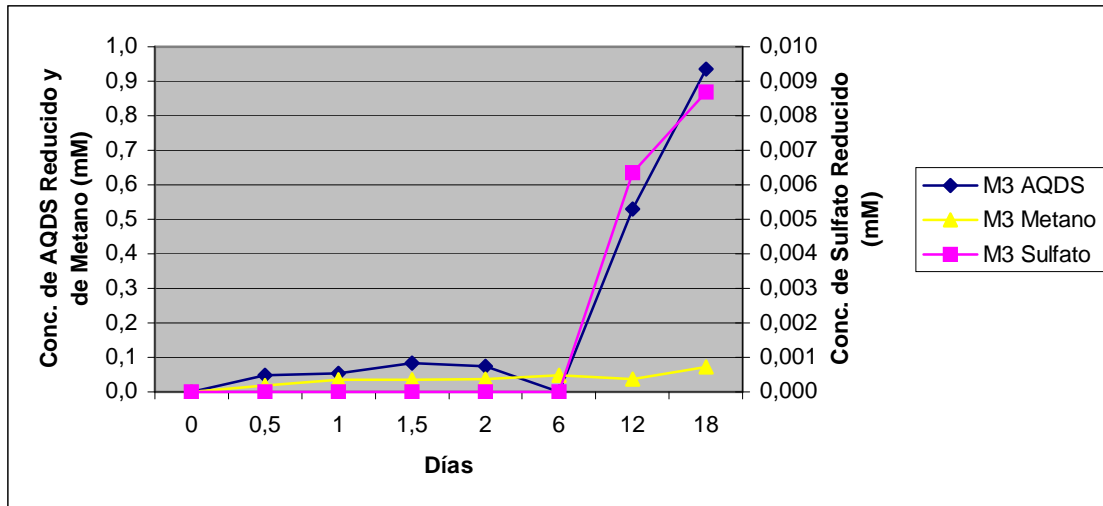


Figura 17. Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (2 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con propionato como donador de electrones.

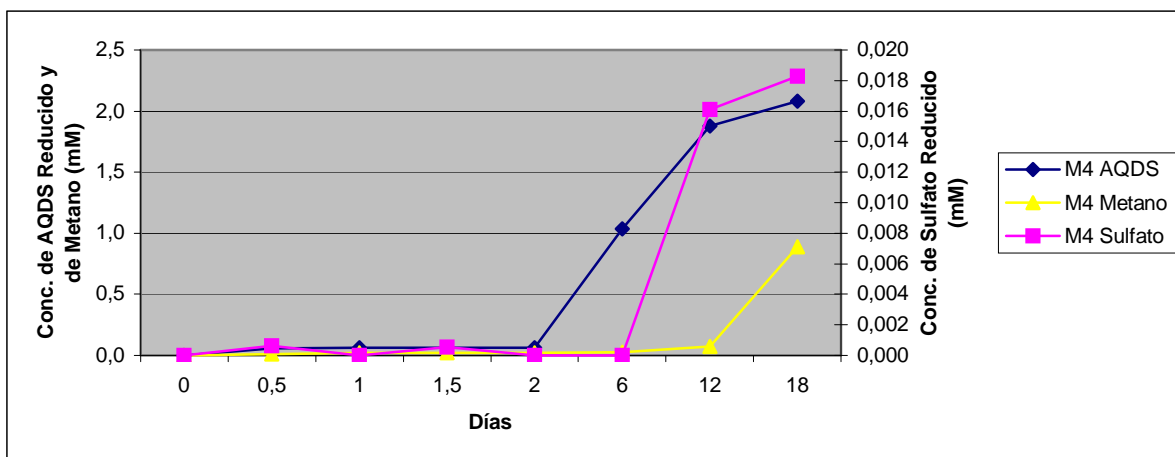


Figura 18. Competencia entre la reducción de sulfato (4 mM), AQDS (2 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con propionato como donador de electrones.

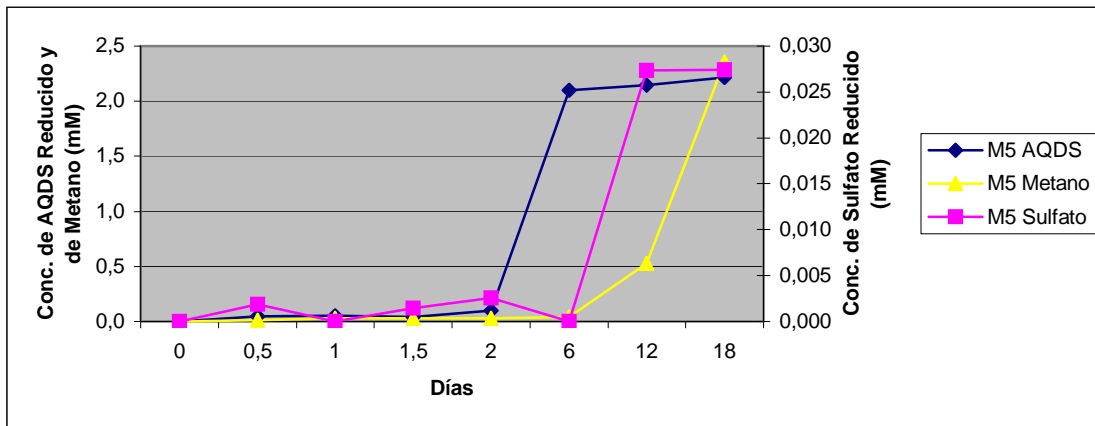


Figura 19. Competencia entre la reducción de sulfato (6 mM), AQDS (2 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con propionato como donador de electrones.

### Experimentos con concentración de AQDS variable y concentración de sulfato constante utilizando ácido propiónico como sustrato

En ausencia de AQDS, el lodo anaerobio presentó una baja velocidad de reducción de sulfato y alcanzó su más alta producción de metano, como puede observarse en la Figura 20. Únicamente se obtuvo una concentración de sulfato reducido de .006 mM después de 18 días de incubación. De manera paralela, se obtuvo una producción de metano de 7 mM después del mismo tiempo de incubación.

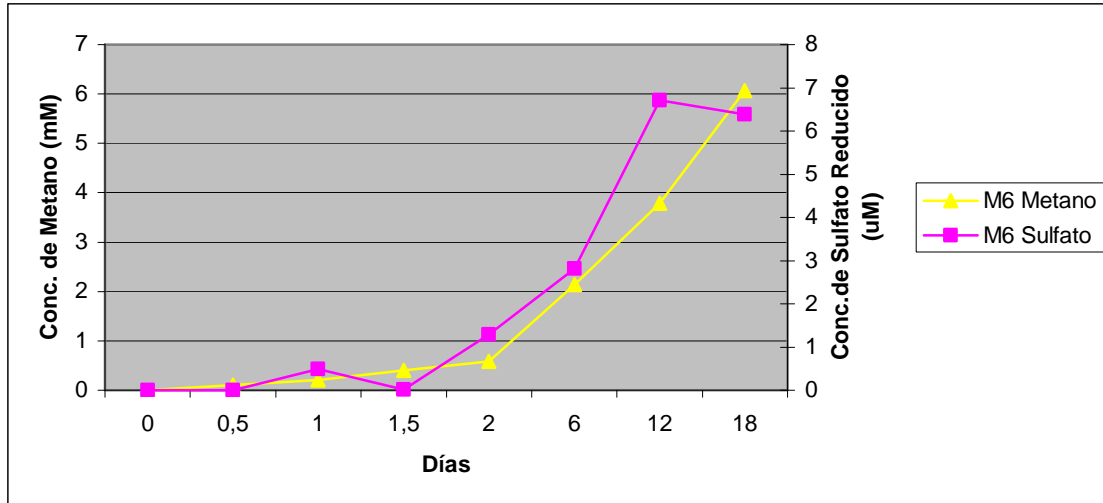


Figura 20. Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (0 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con propionato como donador de electrones.

El incremento en la concentración de AQDS en el medio propició que la velocidad de reducción de sulfato disminuyera aún más. Por otra parte, al incrementar la concentración de AQDS en el medio, se observó que no hubo una mayor velocidad de reducción de este aceptor de electrones. En cuanto a la producción de metano, esta decayó en algunas muestras e incluso se inhibió al aumentar la concentración de AQDS. Sin embargo, la muestra 9 (Figura 22), mostró una producción de metano de 0.023 mM en el 1er día de incubación, siendo ésta la única producción en dicha muestra cuando se empleó lactato como donador de electrones (Figuras 20,21, 22 y 23).

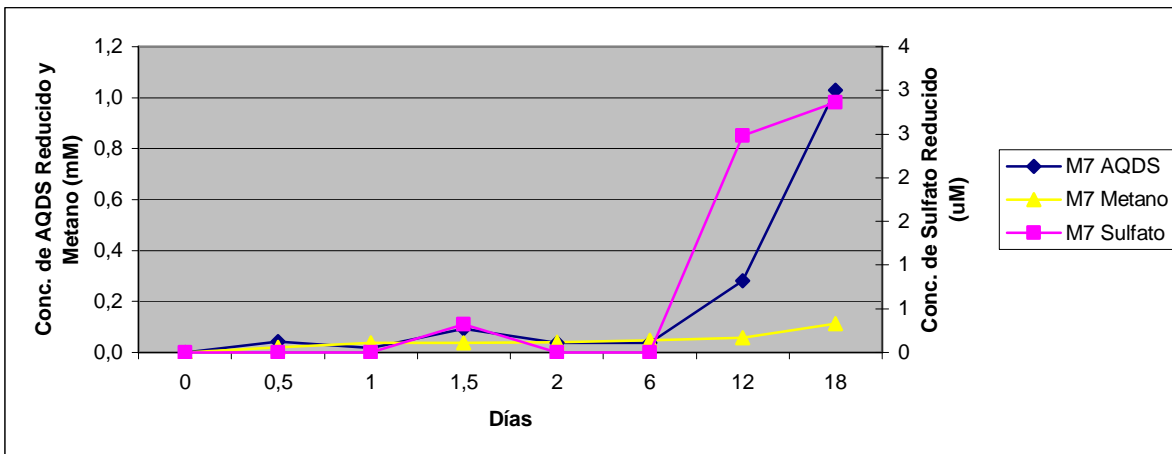


Figura 21. Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (2 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con propionato como donador de electrones.

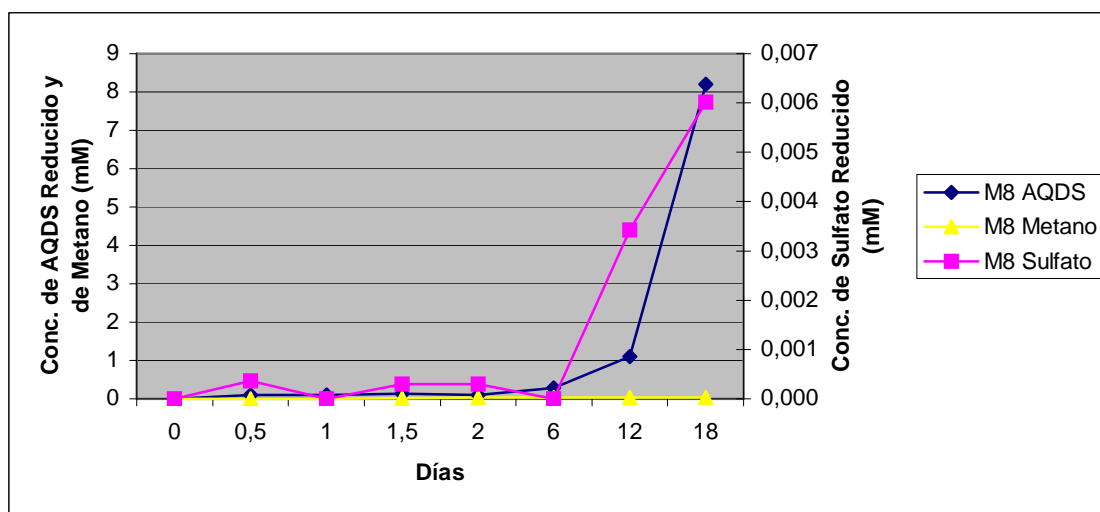


Figura 22. Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (4 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con propionato como donador de electrones.



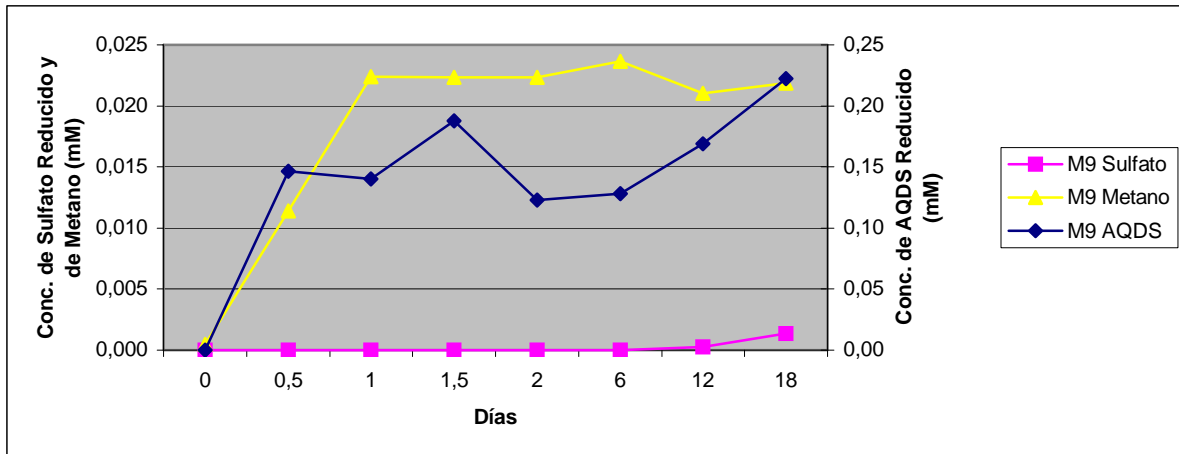


Figura 23. Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (6 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con propionato como donador de electrones.

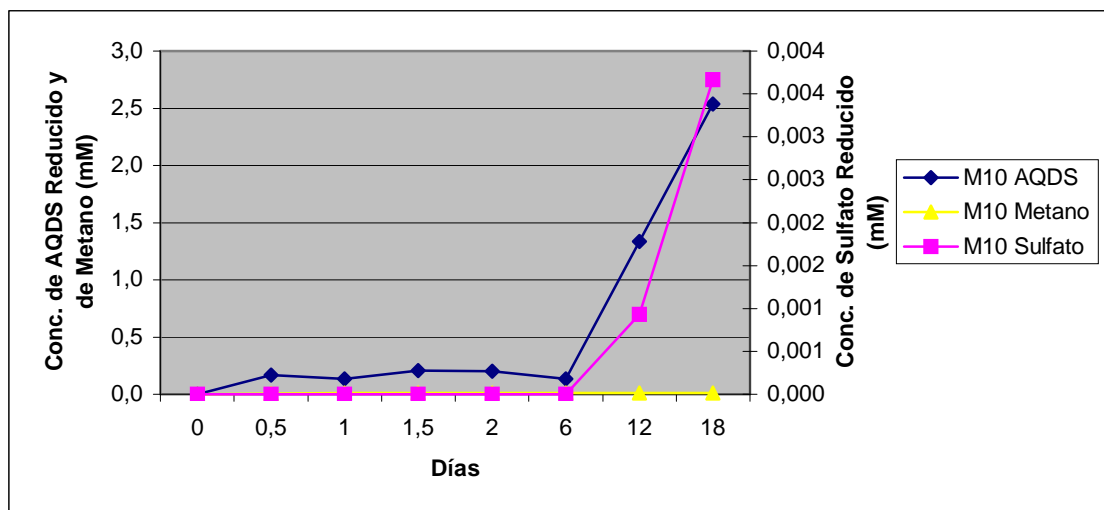


Figura 24. Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (8 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con propionato como donador de electrones.

### Experimentos con concentración de AQDS constante y concentración de sulfato variable utilizando ácido acético como sustrato

En la Figura 25 se muestra la reducción de AQDS (2 mM), utilizando ácido acético como fuente de energía, en ausencia de sulfato. Como se puede observar, la reducción de AQDS ocurrió de manera constante, aunque de manera más lenta comparado con los otros sustratos. Además, se observó una competencia con la metano génesis por este sustrato.

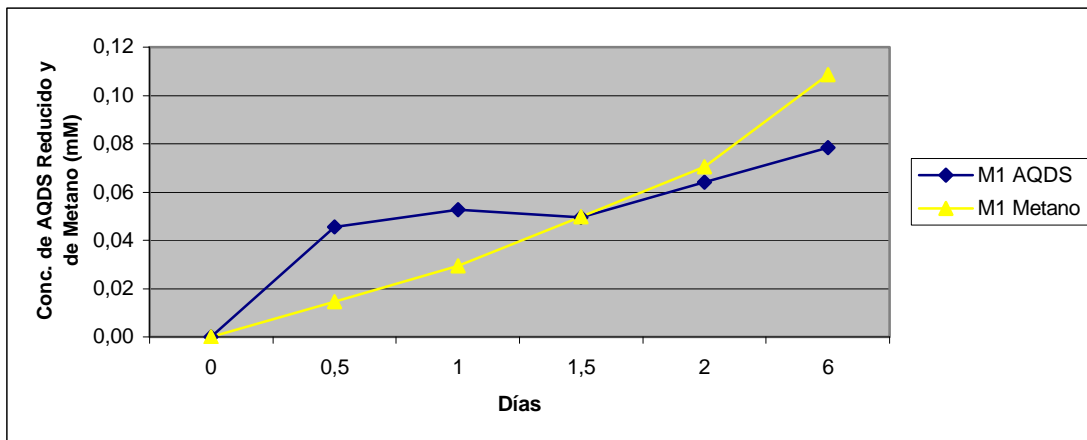


Figura 25. Reducción de AQDS y producción de metano por el lodo anaerobio utilizando ácido acético como sustrato en ausencia de sulfato.

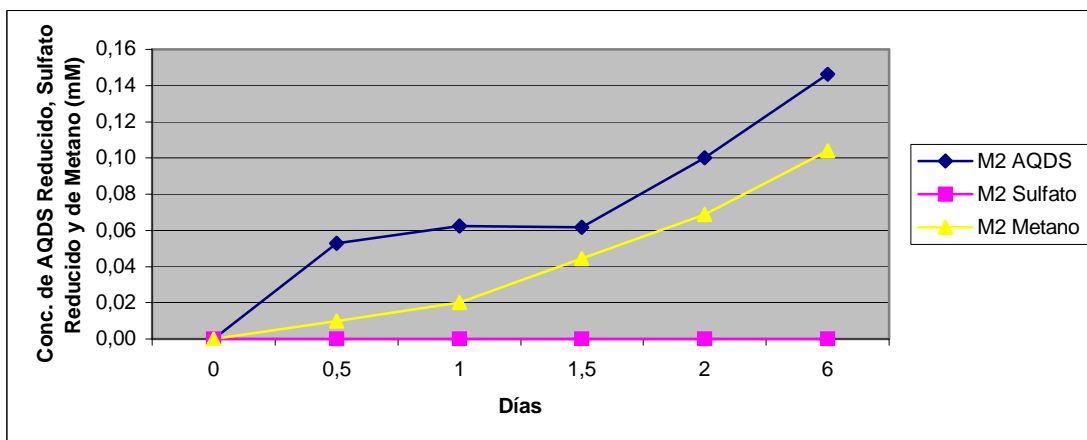


Figura 26. Competencia entre la reducción de sulfato (1 mM), AQDS (2 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con acetato como donador de electrones.

En la Figura 26 se muestran los resultados obtenidos de la incubación del lodo en presencia de sulfato (1 mM) y AQDS (2 mM). Como se puede observar, la reducción de sulfato fue prácticamente nula, mientras que la reducción de AQDS prevaleció sobre la metanogénesis.

La reducción de AQDS prevaleció sobre el proceso de sulfato-reducción aún cuando la concentración de sulfato se aumentó en el medio a 2, 4 y 6 mM como se puede observar en las Figuras 27, 28 y 29. Además, la velocidad de reducción de AQDS prácticamente no se afectó por el aumento en la concentración de sulfato en el medio.

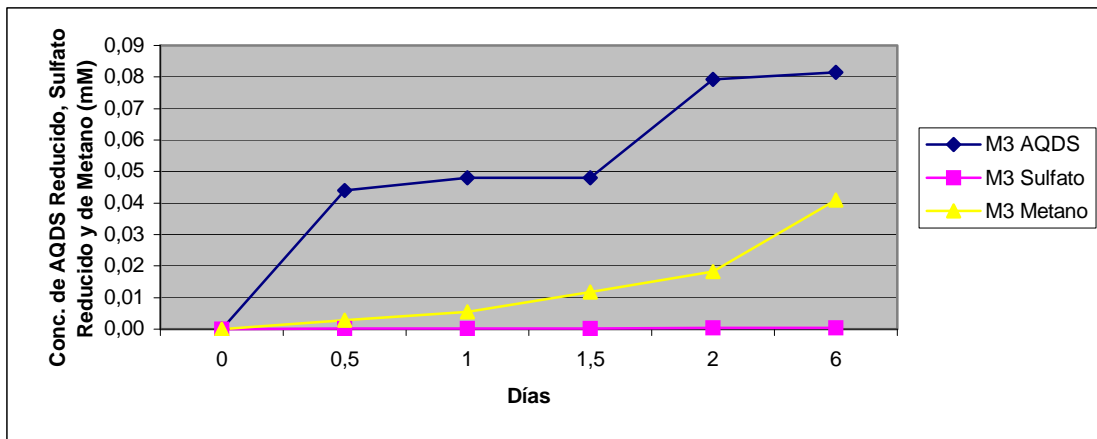


Figura 27. Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (2 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con acetato como donador de electrones.

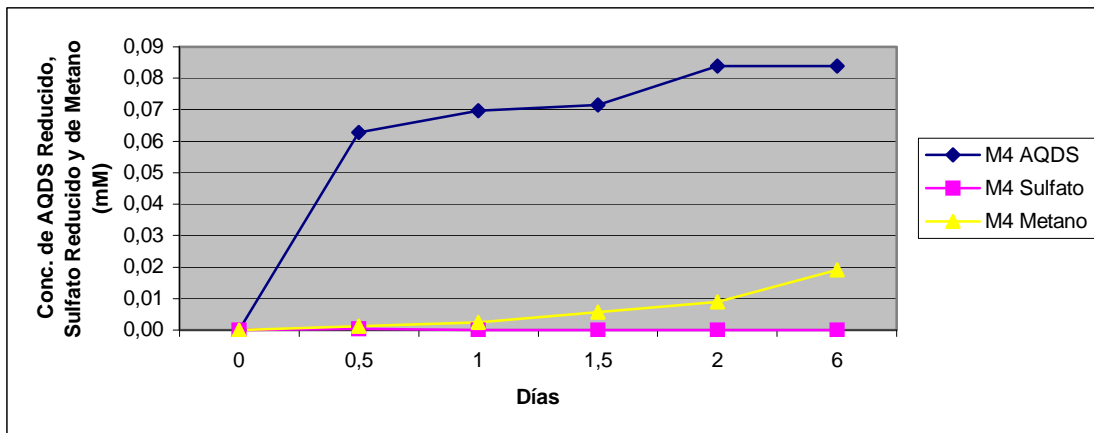


Figura 28. Competencia entre la reducción de sulfato (4 mM), AQDS (2 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con acetato como donador de electrones.

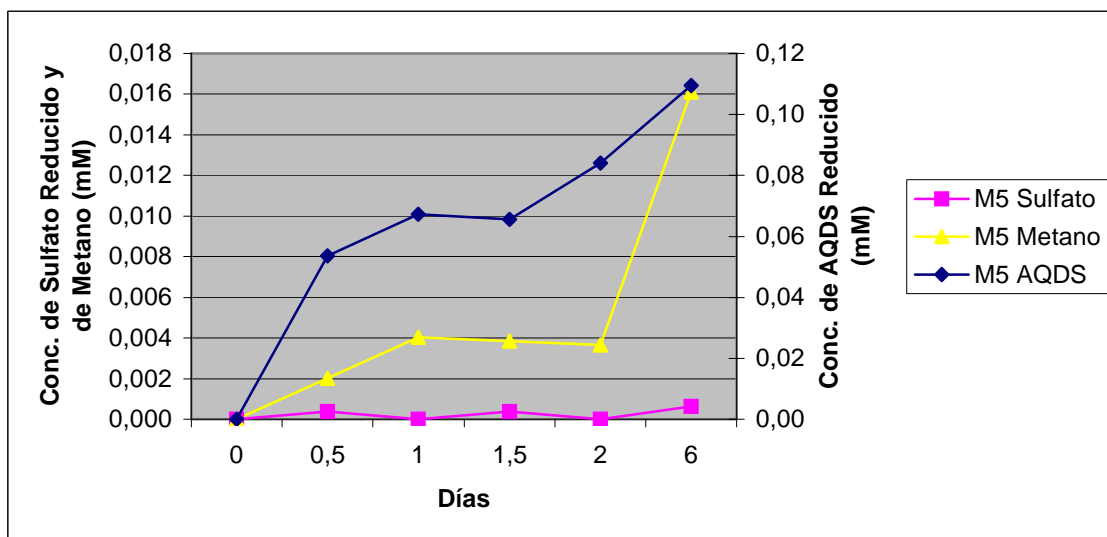


Figura 29. Competencia entre la reducción de sulfato (6 mM), AQDS (2 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con acetato como donador de electrones.

### Experimentos con concentración de AQDS variable y concentración de sulfato constante utilizando ácido propiónico como sustrato

En ausencia de AQDS, el lodo anaerobio presentó una baja velocidad de reducción de sulfato y alcanzó su más alta producción de metano, como puede observarse en la Figura 30. Únicamente se obtuvo una concentración de sulfato reducido de 0.00014mM después de 6 días de incubación. De manera paralela, el metano obtuvo 0.35mM de producción después del mismo tiempo de incubación.

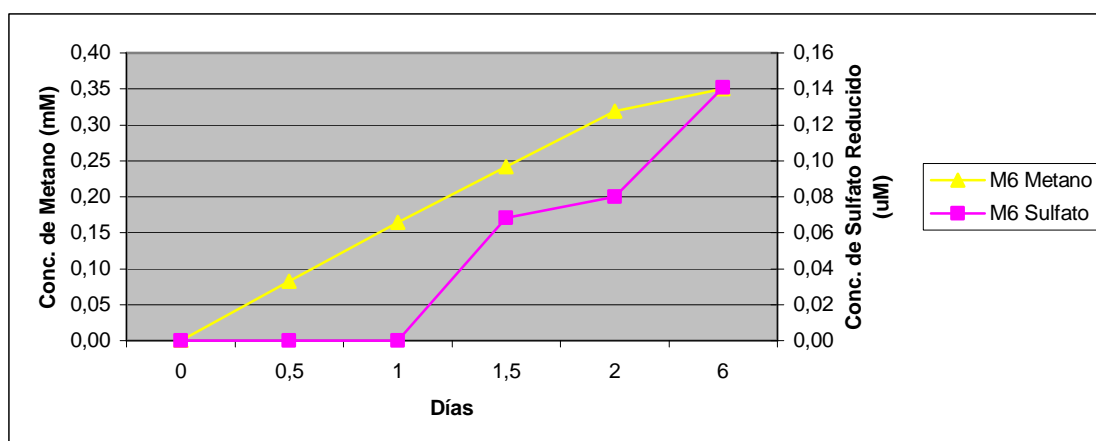


Figura 30. Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), y producción de metano en el lodo anaerobio con acetato como donador de electrones, en ausencia de AQDS.

El incremento en la concentración de AQDS en el medio propició que la velocidad de reducción de sulfato disminuyera aún más hasta el punto de inhibir dicho proceso. Por otra parte, al incrementar la concentración de AQDS en el medio, se observó que hubo un leve incremento en la velocidad de reducción de este aceptor de electrones. En cuanto al metano, la producción de este se mantuvo siempre que la concentración de AQDS fue igual o menor de 2 mM, al ser dicha

concentración mayor, la producción de metano se inhibe cuando se usa el acetato como donador de electrones (Figuras 31, 32, 33 y 34).

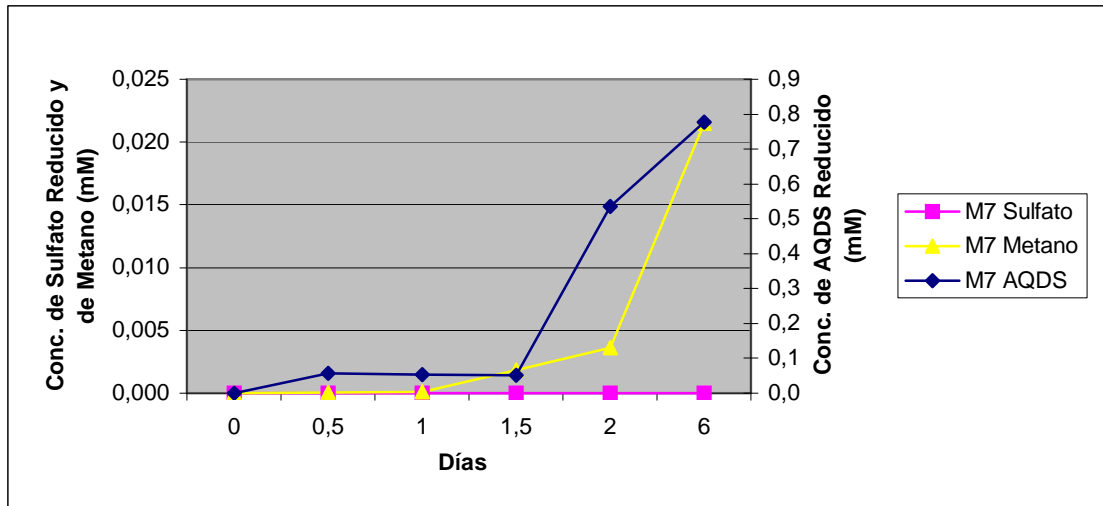


Figura 31. Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (2 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con acetato como donador de electrones.

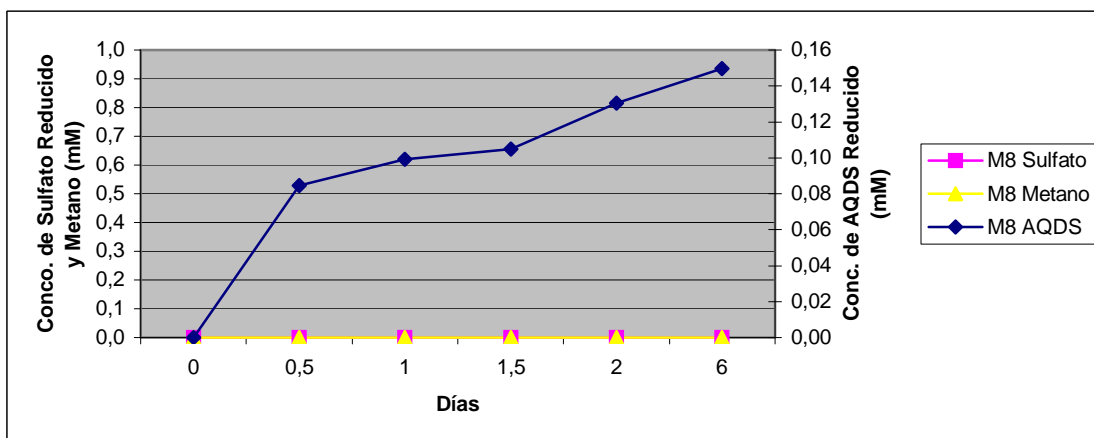


Figura 32. Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (4 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con acetato como donador de electrones.

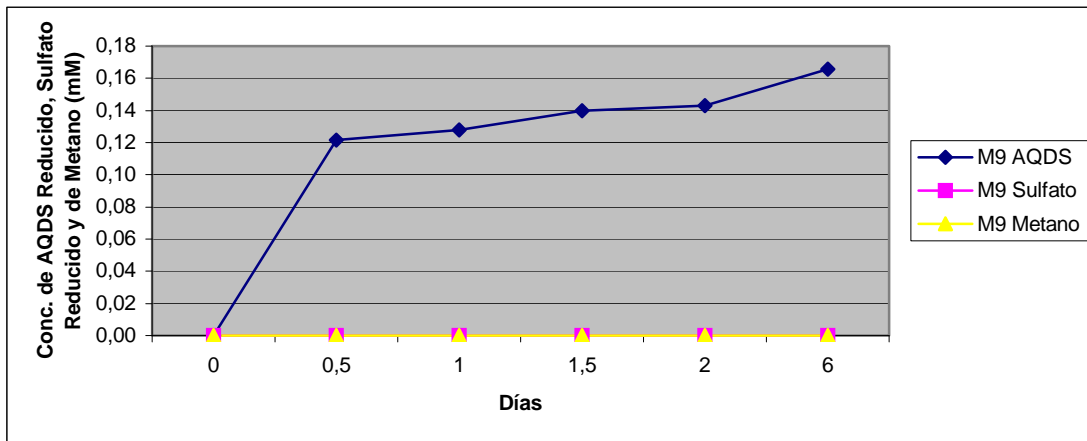


Figura 33. Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (6 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con acetato como donador de electrones.

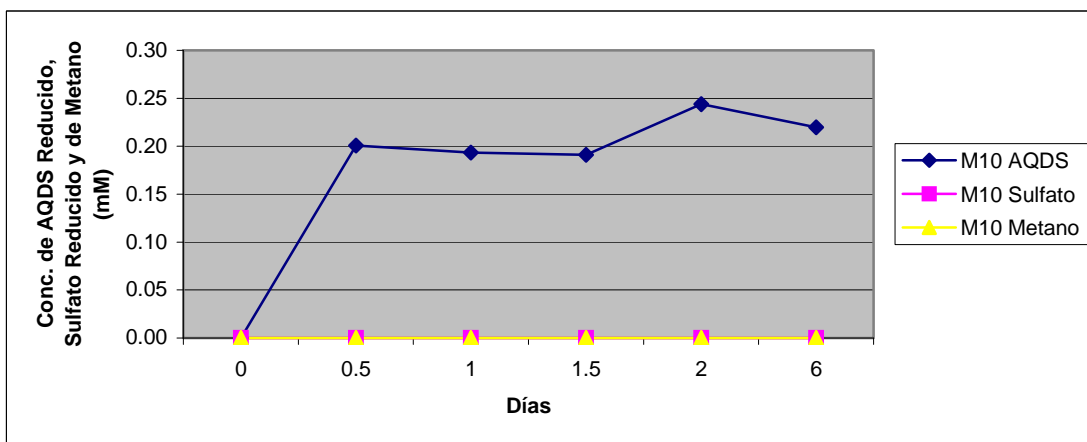


Figura 34. Competencia entre la reducción de sulfato (2 mM), AQDS (8 mM) y producción de metano en el lodo anaerobio con acetato como donador de electrones.

## V.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Durante los experimentos desarrollados se observó claramente que la reducción de quinonas fue el proceso predominante, sin importar el tipo de sustrato utilizado ni la concentración de los diferentes aceptores de electrones. Solamente en algunos experimentos aislados se observó una competencia entre la reducción de AQDS y la metanogénesis. Lo anterior concuerda con los resultados reportados por Cervantes *et al.* (2000a), quienes concluyeron que los microorganismos reductores de quinonas son muy abundantes en diferentes ambientes terrestres y acuáticos. El inóculo utilizado en el presente estudio fue recolectado de un digester anaerobio que trataba efluentes de una fábrica de papel en Holanda. A pesar de que es razonable pensar que los microorganismos metanogénicos son muy abundantes en el inóculo estudiado,



los resultados obtenidos pueden ser explicados de la siguiente manera. Primeramente, la adición de AQDS en los cultivos aumenta el potencial de óxido-reducción (redox), como lo reportan Cervantes *et al.* (2000a), lo cual inhibe el proceso de metanogénesis. Además, la reducción de AQDS es termodinámicamente más favorable que el proceso de metanogénesis. Aunado a lo anterior, cabe aclarar que algunos microorganismos metanogénicos no producen metano en presencia de AQDS, pero a su vez reducen este aceptor de electrones (Cervantes *et al.* 2002).

Las bacterias reductoras de humus compiten de manera directa con las arqueobacterias productoras de metano, lo cual se hace evidente debido a que, mientras mayor es la concentración de quinonas, menor es la producción de metano y viceversa. A pesar de lo anterior, las bacterias productoras de metano, presentaron una mayor competitividad que las bacterias sulfato – reductoras, las cuales si bien nunca fue inhibidas por completo, la sulfato - reducción fue mínima de manera constante a lo largo de todos los experimentos.

El motivo por el cual la metanogénesis fue mayor que la sulfato reducción es debido a que el lodo con el cual se trabajó, proviene de un sistema con bajas concentraciones de sulfato lo cual no propició el crecimiento de bacterias sulfato – reductoras dando paso así a una mayor proliferación de bacterias productoras de metano, lo cual se traduce en una mayor producción de metano y una menor reducción de sulfatos.

## **VI .- CONCLUSIONES**

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación se pudo comprobar parcialmente la hipótesis planteada al inicio de la misma, ya que si bien las bacterias reductoras del humus presentan una mejor acción competitiva como se planteó en un inicio, las bacterias productoras de metano son más competitivas que las sulfato – reductoras en el inóculo estudiado. Por otra parte, la presencia de bacterias sulfato – reductoras y bacterias productoras de metano, no afectan de manera significativa las bacterias reductoras de humus.

## **VII.- BIBLIOGRAFÍA**

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.
- 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., Dijkma, 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.
- 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. (2005). 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. (2005) 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.

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., Obraztsova, 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., 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.

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.

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.
- 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 wastewaters. 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.